

MŰSZAKI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Különböző biológiai eredetű szatietin-
aktivitású anyagok összehasonlító kémiai
analizise

Készítette:

Mazsaroff István

SOTE, Gyógyszertani Intézet

BUDAPEST

1984

Kísérleteimet a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézetében 1982. februárjától végeztem.

Hálás köszönetemet fejezem ki az Intézet Igazgatójának, prof. Dr. Knoll József akadémikusnak, az anyag felfedezőjének, hogy lehetőséget biztosított a munka elvégzésére, és hogy azt mindvégig támogatta.

Nagy hálával tartozom Dr. Nagy Jánosnak, a laboratóriumi munkacsoport vezetőjének, aki a biokémiai kutatás módszereibe bevezetett, a kísérleteket állandóan figyelemmel kísérte, az eredmények kiértékelésében segítségemre volt, és a munkámat mindvégig irányította.

Köszönettel tartozom Dr. Kalász Huba kandidátusnak, az elválasztástechnikai laboratórium vezetőjének a munka során adott értékes tanácsaiért.

Köszönet illeti Dancs Máriát az ábrák gondos elkészítéséért, és PocsKay Tamásnéét, aki a kísérleti munkák során nyújtott értékes segítséget.

Matkócs Béla tudós úrnak hálával
és tisztelettel

Masonoff István

RÖVIDÍTÉSEK

Ala: alanin

Arg: arginin

Asn: aszparagin

Asp: aszparaginsav

Cys: cisztein

/Cys/₂: cisztin

CysSO₃H: ciszteinsav

CmCys: karboximetil-cisztein

GalN: galaktózamin

GlcN: glükózamin

Gln: glutamin

Glu: glutaminsav

Glp: piroglutaminsav

Gly: glicin

His: hisztidin

Ile: izoleucin

Leu: leucin

Lys: lizin

Met: metionin

MetO₂: metionin-szulfon

MetSO₃H: metánszulfonsav

Nle: norleucin

Orn: ornitin

Phe: fenilalanin

Pro: prolin

Ser: szerin

Thr: treonin

Trp: triptofán

Tyr: tirozin

Val: valin

DANS-: /danzil-/: 1-dimetil-amino-naftalin-5-szulfonil-

Tris: trisz-/hidroxi-metil/-amino-metán

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

BSA: bovin szérum albumin

TCA: triklór-ecetsav

R_f : retenciós faktor

$$\left(\frac{\text{az anyag vándorlási távolsága a starttól}}{\text{az oldószerfront vándorlási távolsága a starttól}} \right)$$

R_S : felbontóképesség

EDTA- Na_2 : etilén-diamin-tetra-ecetsav dinátrium só

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS

IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	1.
1. A szatietin-aktív anyagok biológiája és izolálása.....	1.
1.1. A glikoproteinek tulajdonságai.....	1.
1.2. A szatietin-aktív anyagok biológiája...	2.
1.3. A szatietin-aktív anyagok izolálása....	4.
2. Módszertani rész.....	8.
2.1. Összfehérje-tartalom meghatározása.....	8.
2.2. Aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása.....	10.
2.2.1. Mintaelőkészítés, hidrolízis....	10.
2.2.2. Aminosavak meghatározása vékonyréteg-kromatográfiával.....	16.
2.2.3. Aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása aminosav-analízátorral.....	18.
2.3. Peptidlánc végcsoportjainak meghatározása.....	26.
KISÉRLETI RÉSZ.....	
3. Anyagok és módszerek.....	30.
3.1. Felhasznált vegyszerek és anyagok.....	30.
3.2. A vizsgált minták.....	30.
3.3. Alkalmazott módszerek.....	35.

3.3.1. Összfehérje-tartalom meghatározása..	35.
3.3.2. Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok.....	36.
3.3.3. Aminosavak meghatározása aminosav-analizátorral.....	37.
3.3.4. Végcsoport meghatározások.....	42.
4. Eredmények.....	44.
4.1. Összfehérje-tartalom meghatározása.....	44.
4.2. Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok.....	47.
4.3. Aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása.....	56.
4.4. Végcsoport vizsgálatok.....	79.
EREDMÉNYEK ÉRTÉKELESE, DISZKUSSZIÓ.....	82.
ÖSSZEFOGLALÁS.....	89.
IRODALOMJEGYZÉK.....	92.

BEVEZETÉS

1978-ban Knollnak sikerült a humán vérplazmában egy addig ismeretlen anyagot kimutatni, ami hosszú ideig ^{96}h / éheztetett állatoknál drasztikusan képes csökkenteni a táplálékfelvételt /2/. Ezt az új endogén anyagot szatietinnek nevezte el. Ezután a SOTE Gyógyszertani Intézetében olyan kísérletek indultak meg, amelyeknek az volt a célja, hogy ezt az anyagot nagyobb mennyiségben állítsa elő, amely lehetővé teszi az anyag további, részletes biológiai vizsgálatait, valamint kémiai jellemzését. A továbbiakban Knollnak sikerült nemcsak emberi, hanem állati vérplazmában is detektálni hasonló biológiai hatású anyagokat. A témával kapcsolatos kémiai munkálatokba kapcsolódtam be, mintegy két és fél évvel ezelőtt. Az előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy a szatietin-aktív preparátumok - az eddig ismert anorexiás vegyületekkel szemben - glikoproteinek, melyek szokatlanul magas koncentrációban tartalmaznak szénhidrátot.

A preparátumok glikoprotein természetét savas hidrolízis után a szabad aminosavak detektálása ill. az anyag egyszerű, a cukrokra jellemző reakciói ill. festés, pl. orcin-kénsav pozitivitás tette valószínűvé. A további, szisztematikus vizsgálatok már egyértelműen igazolták, hogy a biológiailag aktív, a táplálékfelvé-

telt drasztikusan gátló anyag magas cukor /40-60%/ és viszonylag alacsony peptid /14-40%/ tartalmu glikoprotein. Mindamellett, hogy a tisztított szatietin-aktív preparátumok glikoprotein természete már igazoltnak látszott, a kémialilag mind homogénabb termékek, valamint az izolált, tiszta szatietin fehérje kémiai sajátosságainak tisztázása még hátramaradt. A tisztított és a már rendelkezésre álló tiszta szatietin-aktív anyagok peptidtartalmának analízise fundamentális jelentőségű a teljes kémiai szerkezet megismeréséhez. Ezeknek a vizsgálatoknak az elvégzésére az aminosav analitika speciális módszereinek alkalmazása vált szükségessé.

Célkitűzéseimet ez alapján határoztam meg:

- 1./ A fehérjeanalitikában alkalmazott módszerek speciális adaptálása és továbbfejlesztése a szatietin-aktív preparátumok, ezen extrém tulajdonságokkal és összetétellel rendelkező anyagok pontos analitikai értékeléséhez.
- 2./ A szatietin-aktív minták /humán szatietin és szatietin-D, szarvasmarha és liba szatietin-aktív preparátumok/ összfehérje tartalmának különböző úton történő meghatározása.
- 3./ A vizsgált mintákban az aminosavtartalom minőségi és mennyiségi meghatározása vékonyréteg-kromatográfiával ill. aminosav analizátorral.
- 4./ A peptidlánc ill. láncok végcsoportjainak vizsgálata, az N- és C-terminális aminosavak analízise.

1. A szatietin-aktiv anyagok biológiája és izolálása

Mint már a bevezetőben említettem, a szatietin-aktiv anyagok, amelyek gátolják a táplálékfelvételt, glikoproteinek bizonyultak, ezért röviden ismertetném a glikoproteinek néhány jellemző tulajdonságát.

1.1. A glikoproteinek tulajdonságai

A glikoproteinek közé olyan fehérjék tartoznak, amelyekben a polipeptidlánchoz kovalens kötéssel több-kevesebb szénhidrát kapcsolódik. A glikoproteinekben általában kilencféle egyszerű cukor, illetve cukorszármazék található, maximálisan 15 cukoregységből álló oligoszacharidokká kapcsolódva. Leggyakrabban a galaktóz, mannóz, fukóz /egyszerű hexózok/, N-acetil-glükózamin, N-acetil-galaktózamin, szíálsav, illetve különféle származékai fordulnak elő. A szénhidrátok saját és kapcsolódási izomériája igen sok kombinációs lehetőséget teremt a szénhidrát rész konformációját illetően, ami nagymértékben növeli a glikoproteinek specifikitását. Ez az oka annak, hogy faj-, csoport-, sőt egyedi specifikitást biztosítanak bizonyos sejteknek és szöveteknek /pl. vércsoport, antigéndetermináns, stb. funkciói/.

A vérplazma glikoproteinjeinek szénhidrát tartalma

10-25% körül van. Kivétel a különösen nagy szénhidrát-tartalmu savas α_1 -glikoprotein /orozomukoid, 40% szénhidráttartalom/. A glikoproteinek a szérum alfa-globulin-frakciójában fordulnak elő. A gamma-globulinok és a szérumalbumin is tartalmaz bizonyos mennyiségben szénhidrátot /1/.

1.2. A szatietin-aktív anyagok biológiája

A szatietin 1978-ban felfedezett, ember és emlős szérumából előállított glikoprotein, mely rendkívül hatékonyan, különleges szelektivitással gátolja a táplálékfelvételt /2/. A szatietin mind intracerebro-ventrikulárisan, mind parenterálisan, sőt orálisan adva is hatékonynak bizonyult /3/. Az 1.2./1. táblázat a szatietin anorexiás hatását mutatja, amelyet különböző módon adtak be 96 órát éheztetett patkányoknak. Az anyag szelektíven hatott a táplálkozási központra, és nem mutatott egyéb hatást sem a központi idegrendszeren, sem a periférián. A patkányokon végzett kísérletek során a szatietin hatástalannak bizonyult a viselkedési teszteken, nem befolyásolta a vízfelvételt, a metabolizmus sebességet, a testhőmérsékletet, a vérnyomást és a szexuális viselkedést. Hatáserőssége és specifitása messze felülmúlja az eddig ismert anorexiás hatású endogén anyagokét /kalcitonin, kolecisztokinin/ és fogyasztó-

szereket /amfetamin, fenfluramin/. A szatietin-hatás különböző emlősök /patkány, tengerimalac, nyul, macska, kutya, ló, marha/, valamint liba vérében is kimutatható volt.

A szatietin biológiai tulajdonságai alapján a jóllakottság érzését meghatározó anyag szerepét játszhatja a táplálékfelvétel-szabályozás negatív visszacsatolásában /5,6/.

1.2./1 táblázat

Különböző módon beadott szatietin anorexiás hatása 96

órát éheztetett patkányokon /3/

Kezelés	Állatok száma	Bead. mód	Testsúly /g/ éheztetés		Táplálék felvétel	
			előtt	után	1 ^h /g/ után	24 ^h
fiz. só /20 µl/állat	16	i.c.v.	248,89 ± 8,42	182,38 ± 6,44	7,58 ± 0,63	23,92 ± 0,99
szatietin /4E/állat/	16	i.c.v.	220,56 ± 7,94	147,67 ± 5,60	0,78 ± 0,34 p<0,001	3,22 ± 11,29 p<0,001
fiz. só /0,5 ml/100 g/ 8	8	i.v.	187,5 ± 3,69	156,7 ± 1,32	5,8 ± 0,36	26,60 ± 0,78
szatietin /4OE/100 g/	8	i.v.	215,17 ± 5,64	167,42 ± 5,27	0,33 ± 0,22 p<0,001	10,54 ± 1,43 p<0,001
fiz. só /0,1 ml/100 g/ 8	8	s.c.	243,42 ± 5,56	216,58 ± 5,43	5,23 ± 0,60	21,12 ± 1,83
szatietin /4OE/100 g/	8	s.c.	227,92 ± 9,32	176,58 ± 7,70	0,17 ± 0,17 p<0,001	10,25 ± 1,53 p<0,001
fiz. só /1 ml/állat/	16	oral	221,42 ± 8,76	181,85 ± 14,81	4,52 ± 1,02	19,98 ± 2,87
szatietin 100E/100 g/	16	oral	218,71 ± 6,87	170,86 ± 6,17	1,57 ± 0,69 p<0,02	15,29 ± 2,45 p<0,2

A táplálékfelvétel gátlást a 96 órán át éheztetett patkányokon a szatietin beadását követő 1^h és 24^h időtartam eltelte után az elfogyasztott tápdugó mennyiségének meghatározása alapján biológiai egységekben fejezik ki.

A szatietin minta 100 E/mg fajlagos aktivitású volt /"Egy egységnyi szatietint tartalmazónak tekintjük egy kivonat azon legkisebb mennyiségét, mely intracerebroventrikuláris adagolás mellett a 96 órán át éhező patkányok 24 órás táplálékfogyasztását 10 g alá csökkenti"/4//. Szórásszámítás: Student t teszt, 2 mintás

1.3. A szatietin-aktív anyagok izolálása

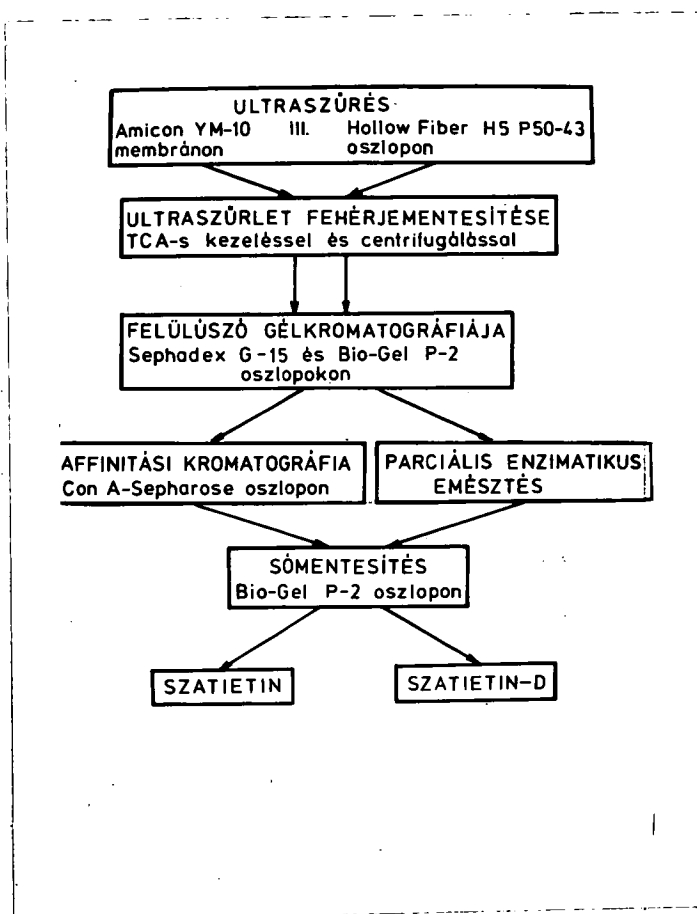
A korábban előállított nagytisztaságú szatietin-minták izolálási lépései a következők voltak: ultraszürés Amicon UM 10 membránon, gélkromatográfia Sephadex G-15 és Bio-Gel P-2 oszlopon, preparatív elektroforézis Whatman 3M papíron és affinitási kromatográfia Con A-Sepharose oszlopon. Az így nyert anyag relatív molekulatömege 67-70.000, izoelektromos pontja 7,00-7,01 /7,8/.

Laboratóriumunkban ujabban két, párhuzamosan használt tisztítási eljárással állítunk elő szatietin-aktív anyagokat emberi szérumból. A tisztítások lépései az 1. ábrán láthatók. A szérumot Amicon YM 10 síkmembránon

illetve Amicon hollow fiber H5 P50-43 szűrőn szűrtük. Az első a 10.000-nél, a második az 50.000-nél nagyobb relativ molekulatömegű molekulákat tartotta vissza. Az ultraszűrletet 10%-ra telítettük triklór-ecetsavval, aminek következtében a szérumfehérjék kicsapódtak. Ultracentrifugálás /30.000xg/ után a felülusztót gélikromatográfiával tisztítottuk tovább, első lépésben Sephadex G-15 oszlopon /2,5x90 cm, illetve 10x100 cm/, 6,6 pH-ju 0,1 mol/l ammónium-acetát pufferes eluálás-sal. Az aktiv - a gélből kizáródott - frakciókat egyesítettük. /A hollow fiber szűrést a Philaxia Oltóanyag-termelő Vállalatnál, az ezt követő Sephadex G-15 oszlopon végzett géliszűrést pedig a Kőbányai Gyógyszerárugyárban végezték./ Az egyesített aktiv frakciókat mindkét eljárás során liofilizáltuk és desztillált vízben oldva Bio-Gel P-2 /100-200 mesh/ oszlopra /2,5x90 cm/ vittük, és desztillált vízzel eluáltuk. A kizáródott, sómentes anyagot liofilizáltuk. Nagytisztaságu termékeket kaptunk, amelyeknek fajlagos biológiai aktivitása 50-100 g/mg. A tisztítást két uton folytattuk. A sikmembránon /Amicon YM-10/ szűrt mintákat a korábban bevált affinitási kromatográfiával, a hollow fiber szűrőn szűrteket pedig proteolitikus emésztéssel tisztítottuk tovább. Az affinitási kromatográfiát Con A-Sepharose oszlopon /1,7x37 cm/ végeztük. Az oszlopra vitt anyagot α -D-metil-mannozidot tartalmazó Tris-HCl pufferrel

1. ábra

A szatietin-aktiv anyagok tisztítási lépései



eluáltuk, melynek koncentrációja 0-tól 0,5 mol/l-ig lineárisan növekedett. A felkötődött anyag frakcióit egyesítettük, liofilizáltuk, majd Bio-Gel P-2 oszlopon desztillált vizes eluálással sótalánítottuk. Az emésztéses tisztítást a következő módon végeztük: a nagytisztaságu anyagot 0,1 mol/l Tris-HCl pufferben oldottuk /5 mg/ml/, a pH-t 8,2-re állítottuk, tripszint

és kimotripszint adtunk hozzá /0,5 mg/ml/. A keverékhez 5 órán át tartó 38°C-os inkubálás után ismét tripszint és kimotripszint adtunk, az eredeti mennyiség 0,5-0,8-szorosát. Összesen 24 órát emésztettünk, majd az oldathoz 0,1 térfogat 55%-os triklórecetsavat adtunk. Centrifugálás után /10.000xg/ a tiszta felüluszót Bio-Gel P-2 oszlopon tisztítottuk tovább. Az így nyert anyagot Knoll szatietin-D-nek nevezte el /80/.

Szatietin-aktivitással rendelkező anyagot vontunk ki szarvasmarha és liba szérumból is. A tisztítás lépései röviden a következők voltak: ultraszűrés YM 10 membránszűrőn, triklórecetsavas kicsapás és gélkromatográfia két lépésben: Sephadex G-15 és Bio-Gel P-2 oszlopon.

2. Módszertani rész

2.1. Összfehérje-tartalom meghatározása

Biológiai minták fehérjetartalmának meghatározására számos eljárást dolgoztak ki. Az eljárások lényege, hogy a fehérjetartalmu mintát valamilyen alkalmas ágenssel reagáltatva színes vagy fluoreszkáló terméket kapunk. A termék abszorbanciáját mérjük, és ismert fehérjekoncentrációju standard oldatokkal - a Lambert-Beer törvény alapján - felvett kalibrációs görbe segítségével a minta fehérjetartalmát meghatározzuk.

A biuret reakciót mintegy 60 éve használják fehérjék mennyiségi meghatározására /9/. A kezdetben használt reagensok instabilak voltak, és a reakcióelegy a reakció során zavaros lett, amit extrakcióval kellett eltávolítani. Ugyanez a hátránya a citrátot vagy etilén-glikolt tartalmazó reagenseknek is. Weichselbaum kálium-nátrium-tartarátot adott a biuret-reagenshez, amivel megakadályozta a reakciókeverék zavarosodását /10/. A Cu /II/ autoredukcióját kálium-jodid hozzáadásával gátolta meg.

A mintában lévő esetleges dextrántartalom a rézzel csapadékot képez, amit mérés előtt centrifugálással el kell távolítani. A zavaró zsírtartalomtól a reakcióelegy di-etiléteres extrakciójával lehet megszabadulni /11/.

Fehérjék, peptidek biuret-reakciója során ibolya szín keletkezik, aminek abszorpciós maximuma 550 nm-nél van. A reakció sztöchiometriáját Strickland és munkatársai tanulmányozták, és ők írták le a fehérje-réz komplex szerkezetét is /12/.

Mivel a módszer anyagigénye viszonylag nagy volt, kidolgozták a mikro-biuret technikát, ami kb. 10 µg/ml fehérjekoncentráció meghatározását teszi lehetővé /13/.

A másik általánosan használt módszer a Lowry-féle fehérjemeghatározás.

Wu 1922-ben javasolta a Folin-fenol reagenst fehérjék mérésére /14/. Folin és Ciocalteu 1927-ben írta le a nevükkel fémjelzett reagenst /15/. Lowry és munkatársai 1951-ben egy, a Folin-Ciocalteu reagenst is felhasználó módszert közöltek, ami lehetővé tette a fehérjék mikrogrammnyi mennyiségének /~ 4 µg/ml/ meghatározását /16/. A fehérjemintát alkáli-réz reakció után Folin-reagenssel reagáltatták. A szín keletkezésének oka részben az alkáli-réz reakció, részben pedig, hogy a fehérjében lévő tirozin és triptofán redukálják a foszformolibdenátos és foszforwolframátos reagenst. Bár az alkáli-réz reakció és a biuret-reakció rokonnak látszik, nem pontosan arányosak. Az alkáli-réz reakció a Lowry-reakcióban létrehozott abszorbancia növekménye közel százszor nagyobb, mint a biuret-reakcióval kapott szín abszorbanciája.

A módszer előnye a nagy érzékenység. Hátránya viszont, hogy a keletkező szín erőssége különböző fehérjéknél más és más, és nem pontosan arányos a koncentrációval. Hátránya továbbá, hogy a meghatározást zavarja a mintákban jelenlévő szénhidrát és lipid. Ez utóbbi hátrányokat szünteti meg Peterson módosított Lowry-módszere /17/.

2.2. Aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása

A fehérjék és peptidek aminosavtartalmának minőségi és mennyiségi meghatározásakor alapvető fontosságu, hogy a vizsgált minta nagy tisztaságu legyen. A peptidkötésben lévő aminosavakat hidrolizissel szabadítják fel, és az így nyert szabad aminosavakat vagy közvetlenül, vagy valamilyen származékképzés után a megfelelő kromatográfiás módszer alkalmazásával határozzák meg.

2.2.1. Mintaelőkészítés, hidrolizis

A hidrolizishez leggyakrabban a forrásban lévő 6 mol/l sósavat használnak. A vizsgálandó anyagot 6 mol/l sósavban oldják vagy szuszpendálják. A sav kb. 200-szoros feleslegben van. A savas oldatot nitrogén-

árammal átbuborékoltatják, a kémcsövet szivattyúval leszivatják, majd leforrasztják. Általában 18-72 órán át, 105-110°C-on hidrolizálnak. A savmentesítést NaOH vagy KOH és P_2O_5 jelenlétében vákuum exszikkátorban vagy vákuum szárítószekrényben végzik /18/. Az erős sav és a hő hatására minden peptidkötés felnyílik. Az aminosavak azonban nem azonos sebességgel szabadulnak fel. Viszonylag nehezen szabadul fel a valin, az izoleucin és a leucin, ezért a hidrolízis ideje megnő. A könnyebben felszabaduló és labilisabb aminosavak ezalatt kisebb-nagyobb mértékben bomlanak. /Ezért egy mérésből az aminosavak valódi mennyiségét nem lehet meghatározni./ Ez a károsodás minden fehérjénél más és más /19/. A sósavas hidrolízis során a triptofán gyakorlatilag teljesen elbomlik, bomlását a cisztein és szénhidrát jelenléte még fokozza. Az aszparagin és glutamin teljes mértékben átalakul aszparaginsavvá és glutaminsavvá. Károsodik a treonin, szerin, a cisztein és cisztin, a metionin, a tirozin, kisebb mértékben a prolin, az aszparaginsav és glutaminsav /20-24/. Az egyes aminosavak bomlásának mértéke függ a hidrolízis idejétől és a vizsgált anyag kémiai összetételétől. A problémát többféle módon oldották meg.

Az aminosavak egy részénél /pl. treonin, szerin, tirozin, prolin/ a következő megoldást alkalmazzák. Különböző ideig /ált. 24, 48 és 72 óra/ hidrolizálják a fehérjét, és a kapott eredmények alapján nulla órára

extrapolálnak /22/:

$$\log A_0 = \frac{t_2}{t_2 - t_1} \log A_1 - \frac{t_1}{t_2 - t_1} \log A_2$$

ahol A_0 , A_1 és A_2 az aminosav mennyisége nulla, t_1 és t_2 órás hidrolizis után.

A módszer hibáját ismert összetételű fehérjéken vizsgálták, és általában 5%-nál kisebbnek találták /22/.

Mendez és munkatársai 0,05% 2-merkaptoetanolt, Matsuhara és Sasaki pedig 4% tioglikolsavat adtak a felszabaduló aminosavak védelmére /25,26/.

Eveleigh és Winter gyors hidrolizist irtak le 6 mol/l sósavban 150°C-on hidrolizáltak /27/.

Tsugita és Scheffler $\text{CF}_3\text{COOH-HCl}$ /1:2/ elegyben 166°C-on 25-50 percig, Westall és Hesser pedig sósav-propionsav /1:1/ elegyben 160°C-on percig hidrolizált peptideket /28,29/.

A hidrolizisek során a kén tartalmu aminosavak /cisztein, cisztin, metionin/, a triptofán és a savamidok /aszparagin, glutamin/ szenvedik a legjelentősebb károsodást, ezért ezekre külön meghatározásokat dolgoztak ki.

Sanger a peptid hangyasavas oldatához hidrogén-peroxidot adott, és így a fehérjében lévő diszulfid kötések oxidatív úton bontotta, a cisztinből két ciszteinsav keletkezett, amit savas hidrolizis után határozott meg /30/.

A perhangyasavas oxidáció optimális körülményeit Hirs tanulmányozta /31/. Ryle és munkatársai /32/, Schram és munkatársai /33/ és Pierce /34/ által leírt módszereket is vizsgálta. Ryle és munkatársai módszerével oxidálva a fehérjét, a tirozin mintegy 50%-a átalakult 3-Cl-tirozinná, ami lényegesen csökkenthető, ha a perhangyasavat előre készítjük el, és evvel végezzük az oxidációt, mint ahogy ez a másik két eljárás során történik. /Schram és munkatársai -10°C-on, Pierce 50°C-on végezte az oxidációt./ Hirs úgy találta, hogy - 10°C-on végzett perhangyasavas oxidációnál a cisztin ciszteinsavvá /~90%/, a metionin metioninszulfoná /~100%/ alakult, a treonin és a szerin mennyisége valamivel kisebb volt, mint a nem oxidált mintánál, a többi aminosav detektálható változást nem szenvedett. 0°C-on a tirozin 10%-a 3-Cl-tirozinná alakult, magasabb hőmérsékleten az átalakulás még jelentősebb volt. Ha kloridmentes fehérjét oxidáltak, és oxidáció után nyomokban sem maradt vissza peroxid, akkor a 0°C-on végzett oxidáció eredménye lényegében nem különbözött a -10°C-on végzettétől.

Crestfield, Moore és Stein a cisztein karboxi-metil-ciszteinként /CmCys/ történő meghatározásáról számolt be /35/. A fehérjében lévő cisztint ditiotreitollal redukálták és jódecetsavval alkilezték.

A diszulfidkötések kvantitatív redukálását ditio-treitolal /DTT/ és ditioeritritollal /DTE/ Cleland írta le /36/.

Inglis és Liu hidrolízis után a hidrolizátumban lévő cisztint ditiotreitolal redukálta, és utána nátrium-tetrathonáttal reagáltatta /37/. A ciszteint és cisztint S-szulfociszteinként határozta meg.

A triptofán spektrofotometriás meghatározását többen leírták: a nem denaturált fehérje spektrumából határozták meg a triptofánt a tirozin mennyiségének ismeretében.

Edelhoc, hogy a módszer hibáit korrigálja, a fehérjét 6 M guanidin.HCl-ban denaturálta, ami lényegesen csökkentette a molekula árnyékoló hatásából származó bizonytalanságot /38/. Modellvegyületeken tanulmányozta, hogy a triptofánon és tirozinon lévő különböző szubsztituensek milyen mértékben befolyásolják a két aminosav spektrumát. A triptofánt az abszorpciós spektrum két maximumánál mért adatból határozta meg.

A spektrofotometriás meghatározás korlátai:

- a./ az összes, ebben a tartományban elnyelő anyag /nukleotidok, koenzimek/ befolyásolják a mérést;
- b./ növényi eredetű minták mérésére nem alkalmas;
- c./ az aminosav szekvencia meghatározásánál használt anyag mennyisége nagyon kevés a spektrofotometriás méréshez.

Dévényi és munkatársai ezért inkább a NaOH-os hidrolizist ajánlják /39/.

Simpson, Neuberger és Liu 4 mol/l metánszulfonsavval /0,2% és 3-/2-aminoetil/-indol/ 115°C-on végzett hidrolizist talált a legmegfelelőbbnek a triptofán meghatározására /40/. Azonban, ha a minta szénhidráttartalma meghaladta a 20%-ot, a triptofán pusztulása "katasztrofális" volt.

Penke, Ferenczi és Kovács 3 mol/l merkaptoténszulfonsavval 110°C-on 22 órát hidrolizált, és úgy találta, hogy a triptofán 90%-nál nagyobb mértékben nyerhető ki /41/.

Glikoproteinek aminocukortartalmának meghatározásakor alkalmazott hidrolizis enyhébb és rövidebb, mint a fehérjék esetében, mert az aminocukrok felszabadulása és bomlása sokkal gyorsabb, mint az aminosavaké /47/.

Madden és munkatársai 6 mol/l sósavval 100°C-on 4 órát hidrolizáltak /48/.

Általában 4 mol/l sósavban 100°C-on 4-8 órát hidrolizálnak /49,50/.

A hidrolizist követő preparatív lépések során is kell aminosav veszteséggel számolni. Azért, hogy az ebből eredő hibát korrigálják, hidrolizis előtt a mintához un. belső standardot adnak. A hidrolizis során a standard nem károsodhat, és nem eluálódhat együtt a vizs-

gált aminosavakkal.

A legáltalánosabban használt belső standard a norleucin, amely a leucin után eluálódik /51/.

2.2.2. Aminosavak meghatározása vékonyréteg-kromatográfiával

Az aminosavak vizsgálatánál a vékonyréteg-kromatográfia elsősorban mint kvalitatív módszer használatos.

A vékonyréteg-kromatográfia olyan sík elrendezésű folyadékkromatográfia, ahol egy mozgófázis /oldószer-elegy/ vándorol a rétegelrendezésű állófázison /szorbensen/ és különböző sebességgel, egy vagy több elválasztandó anyagot szállít magával a berendezés által megszabott irányban, a kapilláris erők révén. Közben több fizikai jelenség mehet végbe egyidejűleg /adszorpció, megoszlás, ioncsere/, melyek közül valamelyiknek meghatározó szerepe van. A fentiekből is következtethetően különböző szorbens típusok használatosak a vékonyréteg-kromatográfiában.

Az aminosavak szilikagél rétegen történő elválasztásánál leggyakrabban használt oldószerrendszerek a következők /52-56/:

1. n-propanol - víz /7:3, v/v/
2. n-butanol - jégcet - víz /4:1:1, v/v/

3. fenol - viz /75:25, w/w/
4. n-propanol - 34 s% ammónia /70:30, v/v/
5. metil-etil-ke-ton - piridin - viz - jégecet
/70:15:15:2, v/v/
6. kloroform - metanol - 17 s% ammónia /2:2:1, v/v/
7. kloroform - n-butanol - metanol - jégecet - viz
/100:60:20:20:15, v/v/

Kétdimenziós kromatográfiához a 2. és 3. ill. 6. és 3. párokat ajánlják.

Szabad aminosavak elválasztására egyre szélesebb körben használnak ioncserélő gyantát tartalmazó réteget /pl. DOWEX 50x8/ /57/. Ez esetben futtatószerként nátrium-citrát puffereket alkalmaznak, melyek pH-ja és Na-ion koncentrációja a meghatározni kívánt aminosavak tulajdonságaitól függ /58/. A módszer előnye, hogy a vizsgálandó minta sótartalma az elválasztást nem befolyásolja.

A szabad aminosavakat általában ninhidrin reagenssel detektálják. A ninhidrinnel történő detektálás esetén 1-10 nmol a kimutathatósági határ. Az aminosavak igen kis mennyisége - 10-50 pmol - határozható meg fluoreszkamin és orto-ftálaldehid reagens alkalmazásával /59/.

2.2.3. Aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása aminosav-analizátorral

Az aminosavak pontos mennyiségi és minőségi analizisét automata aminosav-analizátorral végzik. Az analizátor - tulajdonképpen - egy ioncserélő oszlopot tartalmazó kromatográf. Az ioncserés kromatográfiában alkalmazhatók a szokásos frontális, kiszorításos és eluciós módszerek. Aminosavak analitikai meghatározásánál az eluciós kromatográfia bizonyult előnyösnek. A módszer elve, hogy az elválasztandó aminosavakat /ikerionokat/ tartalmazó oldatot ioncserélő gyanta oszlopra visszük fel, amelynek felső részén az aminosavak megkötődnek. Ezután megfelelő összetételű /ionkoncentrációju és pH-ju/ pufferekkel az egyes aminosavakat egymás után leoldjuk. Eluálás hatására az aminosavak gyantán való megkötődésük erősségétől függően különböző - egymástól független - sebességgel vándorolnak az oszlopon. A kialakuló sávokban az illető aminosavak iontört-eloszlása bizonyos feltételek betartása esetén Gauss-görbékkel írhatók le. Az A aminosav koncentrációját leíró görbe maximum pontjának sebessége:

$$\frac{\Delta v_c}{\Delta v_M} / A = \frac{1}{D_A + C}$$

ahol v_c : az oszlop térfogata

v_M : a felöntött oldat térfogata

\mathcal{E} : az ioncserélő oszlop oldattényezője

D_A : az A ion megoszlási hányadosa: $D_A = \frac{[A]}{[A]}$

ahol $[A]$ és $[A]$ az A aminosav koncentrációja a gyantában illetve a mozgófázisban.

Két aminosav elválasztásának hatásosságát elsősorban a megoszlási hányadosok viszonya adja meg. Az elválasztandó A és B aminosavak megoszlási hányadosának viszonyszáma az elválasztási tényező α , ami gyakorlatilag megegyezik a szelektivitási együtthatóval K_D :

$$\alpha = \frac{D_B}{D_A} = \frac{\mathcal{E}_B}{\mathcal{E}_A} \frac{[A]}{[B]} \frac{[B]}{[A]} \approx K_D$$

ahol \mathcal{E}_A és \mathcal{E}_B : A és B aminosavak egyensúlyi koncentrációja a gyantában, mval/ml

$[A]$ és $[B]$: A és B aminosavak oldatban lévő koncentrációja, mval/ml /92/

Minél jobban eltér az A és B aminosav-pár K_D értéke 1-től, annál szelektívebben hajtható végre az elválasztás. A szelektivitási együttható értékét adott aminosav-pár esetén az aminosavak oldatban levő aktivitásának megváltoztatásával befolyásolják. Aminosavak kromatográfiájánál az eluáláshoz megfelelő pH-ju pufferoldatot alkalmaznak. Az aminosavak különböző mértékű disszociációjának megfelelően a megoszlási hányadosok

eltérése módot ad az egyes aminosavak kromatográfiás elválasztására /60-62/.

Az elválasztás hatékonyságát az elválasztási tényezőn kívül dinamikus tényezők is befolyásolják, amelyeknek hatását az elméleti tányérmagasság fogalmával $/h/$ lehet kifejezni. Egy elméleti tányér olyan hosszú oszlop-részletnek felel meg, amelyben áramlás közben a két fázis közti megoszlás egyensúlyba jut. A h értéke három tagból tevődik össze: az elsőben a szemcseméret, a másodikban a gyantán belüli diffúzió, a harmadikban a réte diffúzió szerepel /63/. h értéke csökkenthető a szemcseméret csökkentésével vagy a hőmérséklet növelésével /ami a diffúziós állandók értékét növeli/. Az elméleti tányérmagasság ismeretében az oszlop elméleti tányérszáma $/N/$:

$$\hat{N} = \frac{L}{h}$$

ahol L : az oszlop hossza

A kromatogramból az elméleti tányérszám a következő összefüggés alapján számítható ki:

$$N = 16 \frac{t_R}{W_b^2}$$

ahol t_R : az adott aminosav retenciós ideje, s

W_b : a csucs inflexiós pontjaihoz húzott érintők

által kimetszett alapvonalhossz, s /59,62/

Két csucs elválasztásának mértékét a felbontóképességgel R_s jellemezzük /63/:

$$R_s = \frac{2/t_{R,B} - t_{R,A}}{W_{b,B} + W_{b,A}} = \frac{\Delta t_R}{4\sigma_t}$$

ahol Δt_R : a két csucsmaximum közti távolság, s

σ_t : az átlagos standard deviáció, s

Az első automata aminosav-analizátor megalkotása Spackman, Stein és Moore nevéhez fűződik /66/. Spackman a savas és neutrális aminosavak választására 0,9 x 60 cm-es kationcserélő oszlopot használt. A bázikus aminosavakat egy másik, 0,6 x 10 cm-es kationcserélő oszlopon kromatografálta. Az első esetben az eluciót 52,5°C-on, 3,25 pH-ju, 0,2 mol/l Na-ion koncentrációju, majd 4,25 pH-ju 0,2 mol/l Na-ion koncentrációju nátrium-citrát pufferral, a bázikus aminosavakat pedig 50°C-on 5,28 pH-ju 0,35 mol/l Na-ion koncentrációju nátrium-citrát pufferral végezte. 17,5 μ m szemcseméretű szulfonált gyöngypolimer ioncserélő mügyantát használt. A kromatográfiás idő 3 óra 10 perc, illetve 55 perc volt /67/.

Hamilton és munkatársai az aminosavak egy oszlopon történő elválasztását vizsgálták az oszlophossz, átmérő, szemcseméret, hőmérséklet, pH és a Na-ion koncentráció függvényében /68/. Ma általában egy osz-

lopos három pufferes rendszert használnak, ahol az első két puffer többnyire megegyezik Spackman és munkatársai által a savas és neutrális aminosavak eluálásához javasolt pufferokkal:

A: pH 3,25, 0,2 mol/l Na^+ , nátrium-citrát puffer,

B: pH 4,25, 0,2 mol/l Na^+ , nátrium-citrát puffer,
harmadiknak pedig magas pH-ju és nagy Na-ion koncentrációju puffert alkalmaznak, pl:

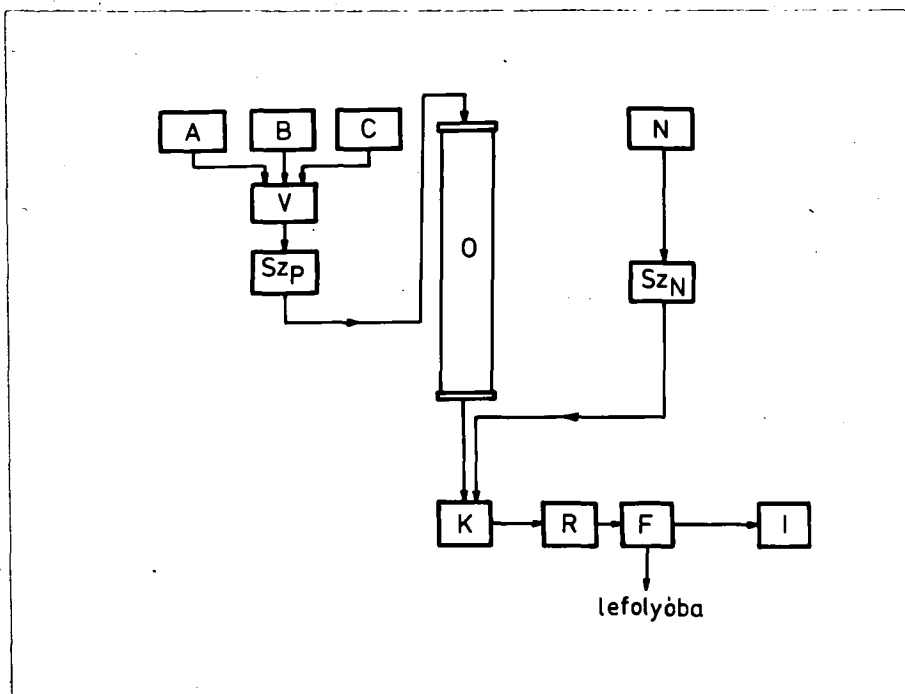
C: pH 7,90, 1,1 mol/l Na^+ , nátrium-citrát puffer.

Az aminosav analizátor működésének vázlatát mutatja a 2. ábra. A vizsgálandó minta az O-jelű oszlopon frakcionálódik a V pufferváltó szelep által megválasztott és az Sz_p jelű szivattyúval szállított pufferral. Az efluens a K jelzésű keverőedényben elegyedik Sz_N szivattyúval szállított ninhidrin-oldattal. A létrejött reakcióelegy az R jelű reakcióedénybe jut, ahol 100°C-os vízfürdőbe merülő kapillárison halad végig, és ezalatt kialakul az aminosavakra jellemző színreakció. Az "előhívott" efluens innen az F fotométeren halad át, melynek folyamatosan mért adatait az I jelzésű irószerkezet rögzíti. Az automata aminosav-analizátorok az egyes aminosavak mennyiségének általában $\pm 2-3\%$ -os pontosságú meghatározására alkalmasak.

Minthogy az egymáshoz igen hasonló viselkedésű aminosavak elválasztási tényezői a gyakorlatban alig térnek el 1-től, megfelelő felbontás eléréséhez igen

2. ábra

Az aminosav analízátor működési vázlatja



fontos az oszlop hatékonyságának növelése. Ezért nagy kapacitású, sztirol-divinil-benzol /8%/ kopolimer alapú, finomszemcséjű /8-14 μm / szférikus ioncserélő gyan-
tát használnak. /A 8%-nál kevésbé térhálós nem elég szelektív, az erősebben térhálós pedig egyrészt lassu működésű, másrészt a nagyobb aminosavakat kis pórus-
mérete miatt nem képes megkötni./

Általában az aminosavak meghatározására ninhidrin reakción alapuló detektálási rendszert használnak. A ninhidrin primér aminokkal történő reakciója színes terméket /Ruhemen-bibort/ eredményez, melynek abszorpció maximuma 570 nm-nél van. α -imino savakkal /prolin,

hidroxiprolin/ sárga színű adduktot ad, melynek abszorpciós maximuma 440 nm-nél van. Ezért a legáltalánosabban használt fotométerek e két hullámhossznál mérik az elnyelést.

Stein és Moore /69/ nátrium-acetát puffert /3,7 mol/l Na^+ , pH 5,51/ és metil-celloszolvot használt a ninhidrin oldat készítéséhez. A ninhidrin oxidatív bomlását ón /II/-klorid ill. hidrindantin hozzáadásával akadályozták meg.

James /70/, hogy az ónklorid reakcióiból származó homokszerű csapadék képződését elkerülje, titán, /III/-kloriddal védte a ninhidrint.

A ninhidrin mellett egyre jobban elterjedt a fluoreszcens terméket adó reagensek használata, például a fluoreszkamin / $\lambda_{\text{gerj}}=390 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=475 \text{ nm}$ / és az ortoftálaldehid /2-merkaptó-etanol jelenlétében/ / $\lambda_{\text{gerj}}=360 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=455 \text{ nm}$ /. A fluoreszcens reagensek előnye, hogy érzékenyebb detektálást tesznek lehetővé, mérsékelt körülmények között reagálnak aminosavakkal, a reakció gyors és az ammóniával nem ad jelet. Hátrányuk, hogy csupán primér aminok meghatározására alkalmasak, ezért a szekunder aminokat a színreakció előtt primér aminná kell oxidálni /71/.

A folyadékkromatográfia fejlődése az aminosav-analizátorokat is átalakította. A puffereket, a ninhidrin-oldatot és az előkészített mintákat hűtött tér-

ben tárolják, a szivattyuk pulzálásmentesek. Előoszlopot alkalmaznak a pufferekben levő ammónia megkötésére, automata mintaadagolót építettek be, nagyszámu minta automatikus /előre programozott/ adagolására. Ugynevezett "kis belső átmérőjű" /microbore/ vagy "intenzív folyadékkromatográfiás" /HPLC/ oszlopban finomszemcsés /8-9 μ m átmérőjű/, nagy felbontóképességű nyomásálló gyantát használnak. A fotóméterben csupán egy, hosszú fényutú, kis térfogatu átfolyó küvettát használnak, és a 440 nm ill. 570 nm hullámhosszon mért fényelnyelésből származó jelet nagyteljesítményű erősítővel erősítik. Katalógusa szerint egy korszerű készülék /LKB 4400/ ninhidrin detektálási rendszerrel 20 pmol, fluoreszcens technikával pedig 2 pmol aminosavat képes meghatározni. A fehérje hidrolizátumok meghatározásához szükséges idő - egyoszlopos, hárompufferes eljárással - mindössze 55 perc. Az aminosav-analizátorba beépített számítógépek lehetővé teszik, hogy a készülékek a minták adagolásától a kromatogramok értékeléséig minden műveletet - előre meghatározott programok szerint - önállóan végezzenek el.

A glikoproteinek hidrolizált mintáiban lévő cukoraminok mennyiségi és minőségi meghatározása aminosav-analizátoron - kationcserélő oszlopon - az aminosavak meghatározásához használt pufferrendszerekkel el-

végezhető. A cukoraminok a semleges aminosavak tartományában eluálódnak /72/.

2.3. Peptidlánc végcsoportjainak meghatározása

A láncvégeken elhelyezkedő aminosavak jellemzők az adott peptidekre és fehérjékre. A végcsoport vizsgálatok információt adhatnak a minta homogenitásáról, és alapot teremtenek a primér szerkezet felderítésének stratégiájához.

Az N-terminális aminosavak meghatározása

Az aminopeptidáz enzim a peptidlánc N-terminális oldaláról sorban, egymás után "lehasítja" az aminosavakat. Különböző inkubálási idő után vett aliquotokat aminosav analízátoron lehet meghatározni. A módszer előnye, hogy ily módon - veszteség nélküli - aminosav-összetételhez lehet jutni, amely összevethető a savas hidrolízis útján nyert aminosav értékekkel, valamint a fehérje N-terminális felőli aminosavszekvenciáját is szolgáltatja. Hátránya, hogy "maszkírozott" aminosav-végcsoport esetén /pl. acetil-származék vagy piroglutamát/ az enzim nem képes megtámadni a fehérjeláncot /73/.

Edman 1950-ben közölt eljárást a peptidlánc N-

terminális felől történő kémiai lebontására /74/. A módszer lényege a peptid N-terminális aminosavának fenil-izocianáttal történő reakciója, amelynek eredményeképpen fenil-tiohidantoin /PTH/-aminosav keletkezik. A reakció több lépésben megismételhető.

Gray és Harley /75/ részben az Edman-lebontás módosításaként, részben az N-terminális aminosav meghatározására önállóan is alkalmas, nagyon érzékeny módszerrel vezetett be, amivel 1-2 nmol aminosav már meghatározható. Az eljárás lényege az N-terminális aminosav dansil-kloriddal történő reakciója. A láncvégen keletkezett - fluoreszcens - DANS-aminosavat savas hidrolízis után mikro-poliamid rétegen határozzák meg.

C-terminális aminosavak meghatározása

A karboxipeptidáz enzimek a peptidlánc C-terminális oldaláról "hasítják le" az aminosavakat. A karboxipeptidáz A, B, C és Y /76, 77/ mellett ma már karboxipeptidáz P-t /78/ is használnak.

A karboxipeptidáz A leggyorsabban az aromás vagy nagy alifás oldalláncu C-terminális aminosavakat szabadítja fel /tirozin, fenilalanin, triptofán, leucin, izoleucin, metionin, treonin, glutamin, hisztidin, alanin, valin és homoszerin/, mérsékelt sebességgel az aszparagint, szerint és metioninszulfont, és na-

gyon lassan a glicint, aszparaginsavat, glutaminsavat, S-karboximetilciszteint és ciszteinsavat. Az enzim nem szabadítja fel a C-terminális prolint, arginint, és lizint. Általában nehezen szabadul fel a C-terminális aminosav, ha az őt követő aminosav prolin.

Az enzim pH 7 és 10 között stabil, az enzimátikus emésztést általában pH 7,5 és 8,5 között végzik. Ha az emésztés során csupán egy aminosav szabadul fel szöchiometrikus mennyiségben, akkor az eredmény kiértékelése nagyon egyszerű. Abban az esetben azonban, amikor néhány aminosav hasonló sebességgel szabadul fel egy viszonylag nagy peptidből vagy fehérjéből, akkor az eredmények kiértékelése különösen nehézé válik, az enzim relatív specifitását kell gondosan figyelembe venni. Ilyen esetekben csak karboxipeptidáz as emésztés alapján veszélyes a peptid C-terminális aminosavát egyértelműen definiálni. A C-terminális aminosav analízis kémiai módszereivel kapott eredményekkel gondosan összevetve lehet csak egyértelmű eredményt adni. Az endopeptidáz as emésztések hátránya, hogy párhuzamosan autolízist /önemésztést/ is végezni kell. /A két mérés különbsége szolgáltatja a valódi eredményt/.

Az enzimátikus hasítás mellett - mint már említettem - alkalmaznak kémiai hasítást is. A kémiai módszerek közül leginkább a hidrazinolízis terjedt el /79/.

A vizsgált fehérjemintát vízmentes hidrazinban 8-10 órán át 100°C -on reagáltatják. A peptidkötések felhasadnak és hidrazidok keletkeznek. Ilymódon csak a C-terminális szabadul fel szabad aminosav formájában /76/.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek és anyagok

Kísérleteimhez a Folin-Ciocalteu reagenst, a szilikagél vékonyrétegeket /Kieselgel 60, 20x20 cm/, a nagyteljesítményű vékonyréteg-kromatográfiás lemezeket /HPTLC Kieselgel 60, 10x10 cm/ és a ninhidrint E. Merck-től /NSZK/, az Aminex A-5 ioncserélő műgyantát, az n-kaprilsavat és az aminosav standardokat a Bio-Rad Laboratories-től /USA/, a DANS-aminosavakat és a karboxipeptidáz A-t a SERVA-től /NSZK/, a tio-diglikolt és a danzil-kloridot a Fluka AG-től /Svájc/, a 4 mol/l metánszulfonsavat és a mikropoliamid réteget /A 1700, 5x5 cm/ a Pierce Chemical Company-től /USA/, az ioncserélő vékonyrétegeket /FIXION 50x8/ a Chinoín-től szereztem be. A rétegekromatográfiás kifejlesztéseket "Desaga Standard" üvegládákban /NSZK/ végeztem. A többi vegyszert analitikai minőségben a Reanal-tól vásároltam. Az oldatok elkészítésénél üvegben bidesztillált vizet használtam.

3.2. A vizsgált minták

Hatféle szatietin-aktív preparátumot /négy humán és két állati eredetű/ vizsgáltam, amelyek a

SOTE Gyógyszertani Intézet kémiai laboratóriumában készültek.

1. Humán szérumból kivont, síkmembránon szűrt, gélkromatográfiával tisztított nagytisztaságú anyag /a továbbiakban: parciálisan tisztított szatietin/
2. Humán szérumból kivont, hollow fiber szűrőn szűrt, gélkromatográfiával tisztított nagytisztaságú anyag /a továbbiakban: parciálisan tisztított szatietin-D/
3. Humán szérumból kivont, az utolsó lépésben Con A-Sepharose oszlopon tisztított homogén anyag /a továbbiakban: szatietin/
4. Humán szérumból kivont, az utolsó lépésben részleges enzimatisztással tisztított homogén anyag /a továbbiakban szatietin-D/
5. Szarvasmarha szérumából kivont nagytisztaságú anyag /a továbbiakban: szarvasmarha szatietin/
6. Liba szérumából kivont nagytisztaságú anyag /a továbbiakban: liba szatietin/

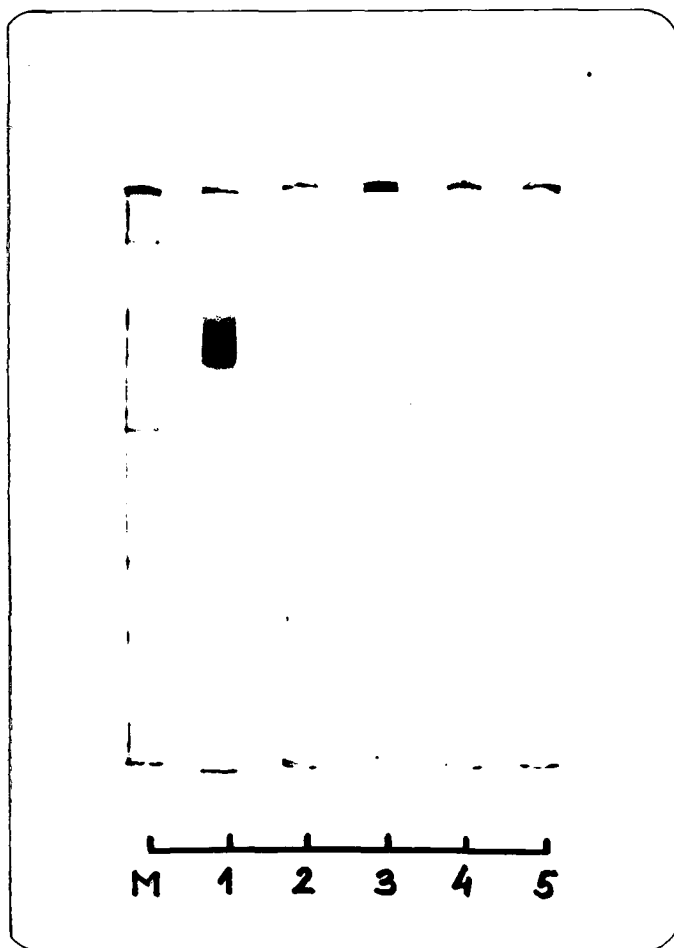
Az anyagok tisztítási lépéseit az Irodalmi áttekintés 1.3. fejezetében részletesen ismertettem.

A szatietin és a szatietin-D /3. és 4. anyag/ anorexiás hatásában nem volt különbség /80/. SDS poliakrilamid gélelektroforézissel és izoelektromos fókuszálással vizsgálva megállapítható volt, hogy mindkét anyag homogén. Coomassie brilliant blue-val és perjódsavas Schiff-reagenssel festve egy-egy sávot detektáltunk, melyek mind a két anyagnál identikusak voltak. /Direkt bizonyíték az anyag glikoprotein természetére./ Az anyagok relatív molekulatömegét Weber és Osborn /79/ módszerével határoztuk meg, a szatietiné 65.000-nek, a szatietin-D-é 43.000-nek bizonyult. Izoelektromos pontjukban is jelentős eltérés mutatkozott, a szatietiné 7,0, a szatietin-D-é pedig 3,0.

Az 1., 2. és az 5., 6. anyag /parciálisan tisztított anyagok/ SDS poliakrilamid gélelektroforézissel nagytisztaságúnak bizonyult. Az állati eredetű szatietin-aktiv anyagok fő komponenseinek relatív molekulatömege egyaránt 39-40.000-nek adódott.

A 3. ábrán a parciálisan tisztított szatietin-D /1/, a szatietin-D /2/, a parciálisan tisztított szatietin /3/, a liba szatietin /4/ és a szarvasmarha szatietin /5/ SDS gélelektroforetikus képe látható Coomassie brilliant blue-val festve.

3. ábra A vizsgált minták SDS gélelektroforetikus képe



- M: Fehérje standard keverék, a gél tetejétől lefelé;
foszforiláz B /92.500/, bovin szérum albumin /67.000/,
tojás albumin /45.000/, karbonát dehidratáz /31.000/,
tripszin inhibitor, szójaból /21.500/, lizozim /14.400/
1: Parciálisan tisztított szatietin-D
2: Szatietin-D
3: Parciálisan tisztított szatietin
4: Liba szatietin
5: Szarvasmarha szatietin

3.3. Alkalmazott módszerek

A dolgozatban tárgyalt vizsgálatokat a 4. ábrán látható analitikai műveleti séma mutatja.

3.3.1. Összfehérje-tartalom meghatározása

A Biuret módszernél felhasznált oldatok a következők voltak:

A/ 0,12 mol/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,32 mol/l K-Na-tartarát $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0,06 mol/l KI

0,04 mol/l NaOH

B/ 0,03 mol/l KI

0,2 mol/l NaOH

C/ 1 térf. A+4B, keverés után szűrtem

0,5 mg mintát 0,4 ml 1 mol/l NaOH-ban oldottam. Ezután hozzáadtam 1 ml C oldatot, kevertem és 30 perc után 550 nm-en mértem az oldat elnyelését. Bovin szérum albumint használtam standardnak.

A Lowry-féle fehérjemeghatározásnál alkalmazott oldatok a következők voltak:

A/ 0,19 mol/l Na_2CO_3 0,1 mol/l NaOH-ban

B/ 0,02 mol/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04 mol/ Na-tartarátban

C/ 60 ml A + 1 ml B

D/ Folin-viz /1:1, v/v/

0,5 mg mintát 0,2 ml vízben oldottam és hozzáadtam 1 ml C oldatot. Kevertetés után 10 percig 37°C-on állni hagytam, majd hozzáadtam 0,1 ml D oldatot, és azonnal összekevertem. 30 percig 37°C-on inkubáltam. Az oldatok elnyelését 750 nm-en mértem. Ezuttal is bovin szérum albumint használtam standardnak.

3.3.2. Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok

Az anyagokat 6 mol/l sósavban 110°C-on 20 órát hidrolizáltam, majd savtalanítottam. /Részletelesen ld. a 3.3.3. pontban, a Sósavas hidrolizis alatt./ A maradékokat 0,01 mol/l sósavban vettem fel. Az így nyert oldatokból aliquotokat vittem a rétegre.

Szilikagél rétegen az

1/ n-butanol - ecetsav - víz /4:1:1/

2/ n-butanol - ecetsav - víz /4:2:2/

3/ fenol - víz /80:20/

4/ fenol - víz /75:25/,

ioncserélő rétegen pedig a

5/ 0,2 mol/l Na⁺, nátrium-citrát pufferek,

pH 2,2-től 4,1-ig

6/ piridin /1 tf %/ - ecetsav pufferek,

pH 2,5-től 7,5-ig

eluenseket használtam.

A 20x20 cm-es lemezeknél az eluens térfogata 200 ml, a HPTLC rétegeknél pedig 50 ml volt.

A futtatás távolsága rendre 15 ill. 8 cm, a startvonal a lemezek alsó széle fölött 3,0 ill. 1,5 cm-re volt. Telítetlen gőzterű kádakban futtattam.

3.3.3. Aminosavak meghatározása aminosav-analizátorral

A minták hidrolizise

Analitikai mérlegen 2,5-3,0 mg súlyú mintákat leszűkitett nyaku, vastag falu kémcsövekbe mértem be. A mintákhoz 500 nmol norleucint adtam.

Sósavas hidrolizis

A bemért mintához 0,4-0,6 ml 6 mol/l sósavat adtam. A kémcsövet vizsugárszivattyúval leszivattam, majd leforrasztottam. $110 \pm 1^\circ\text{C}$ -on 6, 12, 24, 48 és 72 órát hidrolizáltam. Lehűtés után a csövet felnyitottam, a hidrolizátumot vákuum exsikkátorban NaOH fölött beszáritottam. A maradékot 0,5 ml oldópufferral /0,2 mol/l Na^+ , pH 2,2 nátriumcitrát puffer/ felvettem. Az így kapott szuszpenziót a SOTE Gyógyszertani Intézet műhelyében készített, fecskendőhöz csatlakozó szűrőn szűrtem. /Betét: Millipore, 0,45 μm /

Metánszulfonsavas hidrolízis /40/

A bemért mintához 0,3-0,5 ml 4 mol/l metánszulfonsavat /0,2 % 3-/2-aminoetil/indol/ adtam. A csövet leszivattam, leforrasztottam. $115 \pm 1^{\circ}\text{C}$ -on 6, 12, 24 és 48 órát hidrolizáltam. Lehűtés után a hidrolizátumot 1 ml 3,5 mol/l NaOH-dal és 0,5 ml oldópufferral pH 2,0-2,2-re állítottam be, majd szűrtem.

Nátriumhidroxidos hidrolízis /39/

A bemért mintához 0,3-0,4 ml 4 mol/l NaOH-t adtam. A csövet leszivattam, leforrasztottam. $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ -on 3, 5, 10 15 és 20 órát hidrolizáltam. Lehűtés után 0,4-0,6 ml 0,2 mol/l Na^{+} koncentrációju nátriumcitrát puffert, pH 3,25 és 0,15-0,2 ml 37 % sósavat adtam a hidrolizátumhoz, majd szűrtem.

Hidrolízis cukoraminok meghatározásához

A bemért mintához 0,4-0,6 ml 4 mol/l sósavat adtam. A csövet leszivattam, leforrasztottam. 100°C -on 6, 8, 13, 20 és 24 órát hidrolizáltam. Ezt követően a 6 mol/l sósavas hidrolízisnél leírtak szerint cselekedtem.

A triptofán meghatározása

A/ Aminosav-analizátorral

Az előzőekben leírt metánszulfonsavas és nátrium-hidroxidos hidrolizist követően, a szűrletet közvetlenül aminosav-analizátorra vittem.

B/ Spektrofotometrián

Edelhoch /38/ módszerét módosítottam: A mintákból 1,00 mg/ml-es 0,07 mol/l SDS-t tartalmazó vizes oldatokat készítettem. A spektrumokat /270-300 nm/ Spekord UV/VIS típusu /Carl Zeiss, Jena, NDK/ spektrofotométeren 1 cm-es fényutú küvettával vettem fel.

Kéntartalmu aminosavak meghatározása

A/ Perhangyasavas oxidáció

9 rész hangyasavat és 1 rész friss 30% hidrogénperoxidot összekevertem, és szobahőmérsékleten 1 órát állni hagytam. 2,5-3,0 mg mintát 0°C-on az így készült 0,4-0,6 ml perhangyasavban oldottam, és négy órát inkubáltam. Ezt követően - továbbra is 0°C-on - 2-3 ml vizet adtam hozzá, kevertettem, majd liofilizáltam. Az így kapott anyagot 6 mol/l sósavban hidrolizáltam.

B/ Karboximetilezés

2,5-3,0 mg mintát 0,8-1,0 ml 0,1 mol/l Tris-HCl, pH 8,3, 1 mmol/l EDTA- Na_2 -t tartalmazó pufferben oldottam, 4°C-ra lehütöttem és 1 mg monojódecsavat adtam hozzá, majd állni hagytam. 1,0-1,5 ml 4 mol/l metánszulfonsavat adtam az oldathoz és hidrolizáltam.

Aminosav analízis

Az aminosavak mennyiségi és minőségi meghatározását Bio-Cal BC 200 típusú készüléken végeztem. Egyoszlopos technikát használtam. 0,9x50 cm-es Aminex A-5 /13 \pm 2 μm / gyantaoszlopon, 52°C-on végeztem az elválasztást. A pufferszivattyú szállítási sebessége 80 ml/óra, a ninhidrinszivattyúé pedig 40 ml/óra volt. Ninhidrin-detektálást alkalmaztam. A fotométerben két átfolyókvettát használtam, egyet 440 nm-en és egyet 570 nm-en történő elnyelés detektálására. A fotométer által mért adatokat háromcsatornás pontiró rögzítette, melynek két csatornáját használtam.

Az elválasztások során használt nátriumcitrát pufferek /18, 82/:

	A	B	C	D
Na ⁺ konc /mol/l/	0,20	0,80	1,60	0,35
pH	3,25	4,25	6,00	5,28
citrát konc /mol/l/	0,20	0,27	0,037	0,35
etanol konc /mol/l/	0,40	-	-	-

Az alkalmazott ninhidrin oldatok:

1/ Stein és Moore receptjét /69/ módosítottam:

4,00 l metil celloszolv /etilénglikol-monometil-éter/; 1,33 l 3,7 mol/l Na⁺, pH 5,5 nátrium-acetát puffer; 4,7 g SnCl₂ · 2H₂O; 80,0 g ninhidrin

2/ Ugyanaz, mint az 1. recept, azzal a módosítással, hogy a 4,7 g ón-klorid helyett 27,0 ml 15%-os titán /III/-kloridot adtam hozzá.

Az oszlop ekvibrálását A pufferrel végeztem.

A gyantaoszlopra a mintát manuálisan vittem fel. Az oszlop fölött lévő puffert leszívtam, a 0,5-2,0 ml térfogatu mintát egy speciális fecskendő segítségével felrétegeztem az oszlopra, és nagytisztaságu nitrogénnel, 4 bar nyomással benyomattam az oszlopba. A mintaedényt 3x0,5 ml oldópufferrel átöblítettem, és az így kapott oldatokat - a fentiekkel megegyező módon - vittem fel az oszlopra. Ezt követően induló puffert rétegeztem az oszlop fölé, és elindítottam az analízist. Standardként minden esszenciális aminosav és ammónia 500 nmol-ját tartalmazó szintetikus keveréket használtam.

3.3.4. Végcsoport meghatározások

N-terminális aminosav meghatározás danzil-kloridos technikával /75/

Mintegy 0,1 mg /~ 3 nmol/ mintát 4x3 mm-es kémcsőbe bementem. Ezután 10 µl 0,2 mol/l NaHCO_3 -t adtam hozzá, centrifugáltam és a felülusztót vákuumban beszárítottam. A száraz maradékhoz 10 µl vizet és 10 µl danzil-kloridot /2,5 mg/ml acetone/ adtam, összekevertem és Parafilmmel lezárva 37°C-on 1 órán át inkubáltam. Az így nyert elegyet beszárítottam, majd 50 µl 6 mol/l sósavat adtam hozzá, és a csövet leforrasztottam. 18 órás 105°C-on történő hidrolízis után a hidrolizátumot centrifugáltam és a felülusztót vákuum exsikkátorban nátrium-hidroxid fölött beszárítottam. Ezután a maradékot 2-5 µl piridin - víz /1:1/ elegyében feloldottam. A mikro-poliamid réteg egyik sarkába /5-5 mm-re a lemez széleitől/ 1 µl mintát cseppentettem fel. A lemez tulsó oldalára, ugyanarra a helyre, standard DANS-aminosavkeveréket vittem fel /DANS-Gly, DANS-Glu, DANS-Ile, DANS-Phe, DANS-Pro, DANS-Ser, DANS-Arg/. Első irányban 1,5 % hangyasavban, második irányban benzol - ecetsav /9:1/ elegyben futtattam.

C-terminális aminosav meghatározás karboxipeptidázas emésztéssel

40 μ l /1,1 mg/ karboxipeptidáz A-t mikrotölcséren, szűrőpapíron /0,45 μ m/ 10 ml vízzel mostam, majd 1,1 ml 2,0 mol/l NH_4HCO_3 , pH 7,4 oldatban oldottam.

0,05 μ mol mintát egy kémcsőben 5 ml 0,01 mol/l NH_4HCO_3 -ban oldottam, majd 0,36 ml - az előbb leírt módon készített - 1 mg/ml karboxipeptidáz A-t adtam hozzá és kevertem.

Kontroll oldat: 5 ml 0,01 mol/l NH_4HCO_3 és 0,36 ml karboxipeptidáz A oldat.

A minta- és kontroll oldatokat 5, 10 és 20 percig 25°C-on inkubáltam. Az oldatok pH-ját 6 mol/l sósavval 2,0-2,2-re állítottam, az oldatokat szűrtem és az aminosav-analizátor oszlopára vittem.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Összfehérje-tartalom meghatározása

Biuret-reakció

A különböző szatietin-aktív minták reakciójának szinkifejlődése azonos volt, időfüggését az 5. ábra mutatja. A görbe futása gyakorlatilag megegyezett a BSA görbéjével. Harminc perc után a színintenzitása már állandónak tekinthető, ezért a színintenzitását 30 perc után mértem.

A kalibrációs görbéket 0,3, 0,6 és 0,9 mg BSA/ml koncentrációkkal vettem fel. A görbeillesztéseket TI 59 Programable Calculator /Texas Instruments, USA/ Solid State Software "Statistics" programjával végeztem. A korrelációs koefficiens minden esetben jobb volt, mint 0,9998.

A vizsgált anyagok fehérjetartalom-meghatározásainak eredményét a 4.1./1. táblázat tartalmazza. Minden adat három párhuzamos mérés átlaga.

4.1./1. táblázat

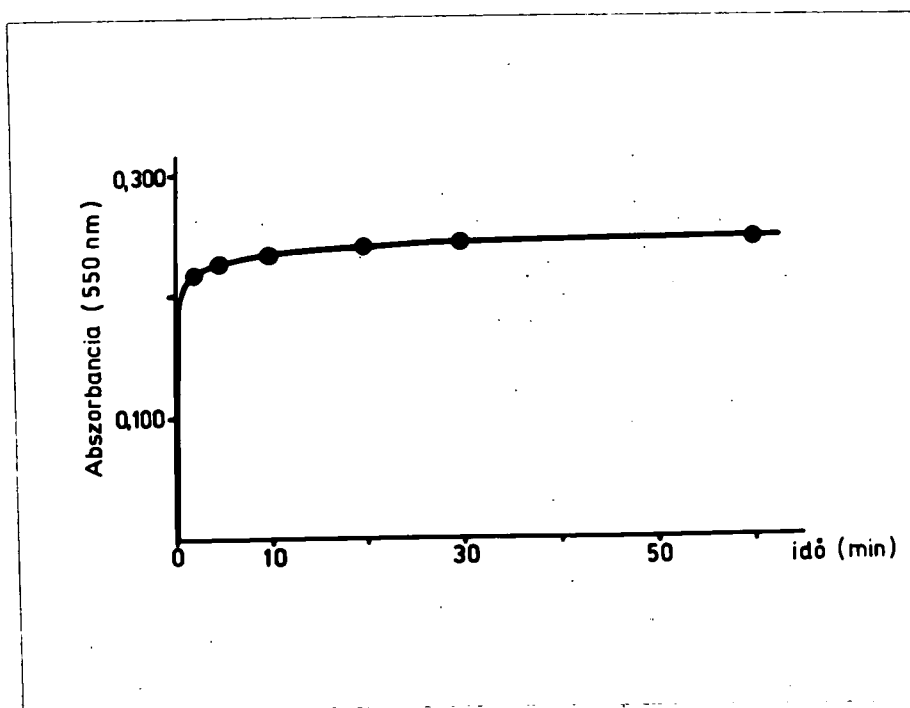
Összfehérje-tartalom meghatározás biuret reakcióval

	fehérjetart., %
parc. tiszt. szatietin	40,8 \pm 0,0
parc. tiszt. szatietin-D	40,4 \pm 0,0
szatietin	n.m.
szatietin-D	20,5 \pm 0,1
sz.marha szatietin	27,9 \pm 0,3
liba szatietin	37,5 \pm 0,2

n.m. = nem meghatározott

5. ábra

A szatietin aktiv-anyagok biuret reakciójának időfüggése



Lowry-féle meghatározás

Az anyagok szinkifejlődésének időfüggése itt is hasonló volt a BSA görbéjéhez, ezért itt is 30 perc után mértem.

A kalibrációs görbéket 0,04, 0,08 és 0,12 mg BSA/ml koncentrációkkal vettem fel. A korrelációs koefficiens minden esetben jobb volt 0,9999-nél.

Az anyagok meghatározott fehérjetartalmát a 4.1./2. táblázat tartalmazza. Az adatok három párhuzamos mérés átlagai

4.1./2. táblázat

Összfehérje-tartalom meghatározás Lowry szerint

	fehérjetart., %
parc. tiszt. szatietin	27,4 \pm 0,3
parc. tiszt. szatietin-D	38,4 \pm 0,3
szatietin	15,7 \pm 0,3
szatietin-D	23,5 \pm 0,0
sz.marha szatietin	23,1 \pm 0,4
liba szatietin	17,9 \pm 0,4

4.2. Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok

A hidrolizált minták első futtatásai után kiderült, hogy a minták nagy mennyiségben tartalmaznak savas és bázikus aminosavakat. Az anyagok glikopeptid természetűe alapján pedig számítani lehetett cukoraminok jelenlétére is /5/. Azokat a rétegekromatográfiás rendszereket tekintettem tehát legmegfelelőbbnek, amelyek ezeket az összetevőket legjobban képesek elválasztani. Előzetes vizsgálatok után szilikagél rétegen az n-butanol - ecetsav - víz és a fenol - víz rendszerek bizonyultak a legalkalmasabbnak feladataim megoldásához. A két rendszer szokásos összetételei közül a számomra legkedvezőbbet kerestem.

A kétfajta butanol - ecetsav - víz rendszerrel végzett standard futtatások eredményeit a 4.2./1. táblázat tartalmazza. $/100 R_{fLeu}$: a Leu-ra vonatkoztatott retenciós faktor százszorososa./

A /4:1:1/ rendszerrel végzett futtatáskor a középső tartomány ritkább, a kis R_f tartomány pedig - ahol a savas és bázikus aminosavak találhatók - sűrűbb, a /4:2:2/ rendszernél az eredmény ennek éppen ellenkezője. A további vizsgálatokhoz ezért a /4:2:2/ rendszert használtam.

A fenol - víz rendszereknél is hasonló elvek alapján - bár itt a különbség kisebb volt - döntöttem: a /80:20/ elegyet választottam /4.2./2. táblázat/.

4.2./1. táblázat

Aminosavak szilikagélen mért retenciós faktorai

butanol - ecetsav - víz oldószerelegyek alkalmazásával

	100 R _f Leu	
	/4:2:2/	/4:1:1/
Ala	58	48
Arg	19	15
Asp	46	29
/Cys/ ₂	22	13
Glu	58	42
Gly	48	38
His	18	13
Ile	-	-
Leu	100	100
Lys	14	10
Met	88	83
Phe	-	-
Pro	42	35
Ser	49	38
Thr	55	46
Tyr	96	94
Val	82	77
GalN	52	42
GlcN	53	43

4.2./2. táblázat

Aminosavak szilikagélen mért retenciós faktorai
fenol - viz oldószerkelegyek alkalmazásával

	100 R _f Leu	
	/80:20/	/75:25/
Ala	55	50
Arg	9	9
Asp	20	16
/Cys/ ₂	25	14
Glu	30	23
Gly	45	39
His	38	30
Ile	-	-
Leu	100	100
Lys	5	5
Met	97	98
Phe	-	-
Pro	109	109
Ser	36	30
Thr	48	41
Tyr	87	84
Val	78	77
GalN	7	7
GlcN	7	7

Tekintettel arra, hogy fenol - víz rendszerben kapott foltok igen kompaktak és az aminosavak elválasztása - főleg a fent említett kritikus helyeken - még mindig nem volt eléggé megfelelő, tulfuttatásos kromatográfiával igyekeztem javítani az elválasztást. Az eredményeket a 4.2./3. táblázat tartalmazza.

4.2./3. táblázat

Aminosavak tulfuttatásos kromatográfiája szilikagélen fenol - víz /80:20/ oldószereleggyel

Kifejtl. idő, h	A folt által megtett ut, mm		
	7,2 ^x	14,3	18,7
Ala	32	57	71
Arg	5	8	10
Asp	12	21	26
/Cys/2	15	26	33
Glu	18	31	39
Gly	26	47	58
His	22	40	48
Ile	-	-	-
Leu	59	104	129
Lys	3	5	6
Met	57	101	125
Phe	-	-	-
Pro	64	113	141
Ser	21	37	47
Thr	28	50	62
Tyr	51	90	112
Val	46	81	101

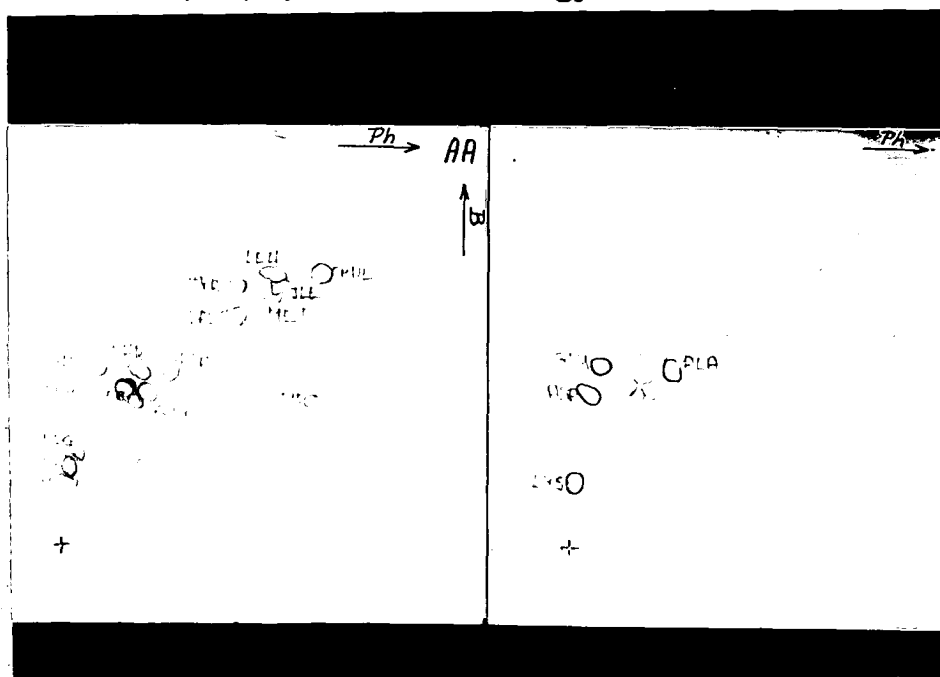
x A nem tulfuttatott - 15 cm-es - kifejlesztés

A két és félszeres túlfuttatásnál /18,7 óra/ a foltok teljesen elkülönültek, diffúziójuk még nem volt nagy.

Kétdimenziós futtatásnál első irányba a butanol - ecetsav - víz /4:2:2/, másodikba pedig a fenol - víz /80:20/ rendszert - 2,5-szeres túlfuttatással - használtam. Közöséges szilikagél rétegen ezzel a "kiélezett" technikával ugyanazt az eredményt értem el, mint HPTLC rétegen egyszerű kétdimenziós kifejlesztéssel. Az utóbbira mutat példát a 6. ábra. A baloldali kép standard aminosavak, a jobboldali pedig a liba szatietin hidrolizátumának elválasztását mutatja.

6. ábra

Standard aminosavak /a/ és liba szatietin hidrolizátumának /b/ elválasztása HPTLC szilikagél rétegen kétdimenziós kifejlesztéssel I. dimenzió /B/:2. oldószerrelegy, II. dimenzió /Ph/:3. oldószerrelegy



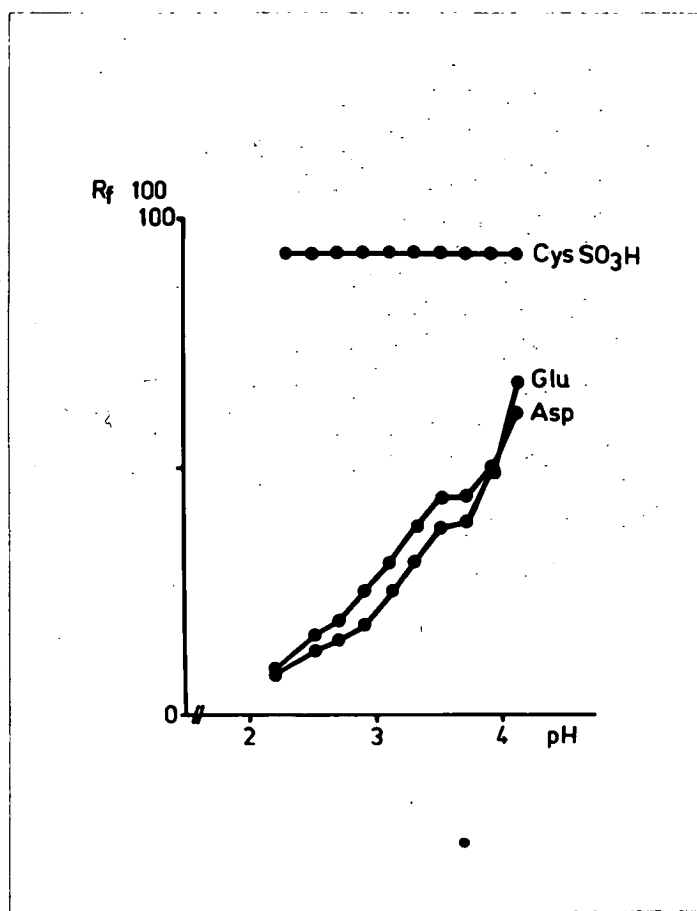
Az ioncserélő rétegen történő elválasztásoknál hasonló szempontok vezettek, mint a szlikagélen végzett vizsgálatoknál. Ezesetben két pufferrendszert tanulmányoztam:

a/ Nátrium-citrát pufferben vizsgáltam a savas aminosavak elválasztását. Állandó, 0,2 mol/l Na-ion koncentráció mellett 2,2 és 4,1 között változtattam a pH-t /7. ábra/. Az Asp és a Glu elválasztásának optimuma pH 3,1 körül van.

b/ Piridin-ecetsavas pufferben - ahol a piridin koncentrációját /1 tf %-ot/ állandó értéken tartottam - a savas-, a bázikus aminosavak és az aminocukrok elválasztását vizsgáltam a pH függvényében /8. ábra/. Az ábrából jól látható, hogy ebben az új rendszerben az aminosavak elválasztása sokkal eredményesebb: a savas aminosavak optimális elválasztását pH 3-nál kaptam, a bázikus aminosavak és cukoraminok elválasztása pedig pH 7,5-nél bizonyult a legjobbnak.

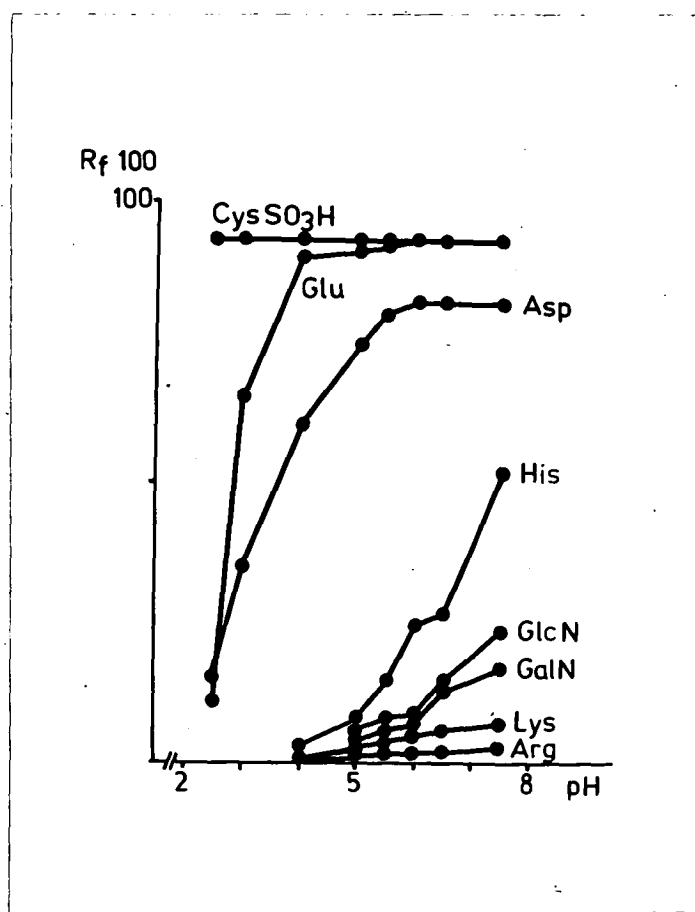
7. ábra

Savas aminosavak elválasztása 0,2 mol/l Na^+ nátrium-
-citrát pufferrendszerben, a pH függvényében



8. ábra

Aminosavak és cukoraminok elválasztása piridin-1 tf %/-
ecetsavas pufferrendszerben a pH függvényében



A minták hidrolizátumaiból vékonyréteg-kromatográfiával a következő aminosavak jelenlétét sikerült detektálni /4.2./4. táblázat/.

4.2./4. táblázat

A vizsgált minták hidrolizátumaiból vékonyréteg-kromatográfiával meghatározott aminosavak

Anyagok	1	2	3	4	5	6
Ala	+	+	+	+	+	+
Arg	+	+	+	+	+	+
Asp	+	+	+	+	+	+
/Cys/ ₂	-	-	-	-	-	-
Glu	+	+	+	+	+	+
Gly	+	+	+	+	+	+
His	+	+	+	+	+	+
Ile	+	+	+	+	+	+
Leu	+	+	+	+	+	+
Lys	+	+	+	+	+	+
Met	-	-	-	-	-	-
Phe	+	+	+	+	+	+
Pro	+	+	+	+	+	+
Ser	+	+	+	+	+	+
Thr	+	+	+	+	+	+
Tyr	+	+	+	+	+	+
Val	+	+	+	+	+	+
GalN	-	-	-	-	-	-
GlcN	+	+	+	+	+	+

1. parc. tiszt. szatietin
2. parc. tiszt. szatietin-D
3. szatietin
4. szatietin-D
5. sz.marha szatietin
6. liba szatietin

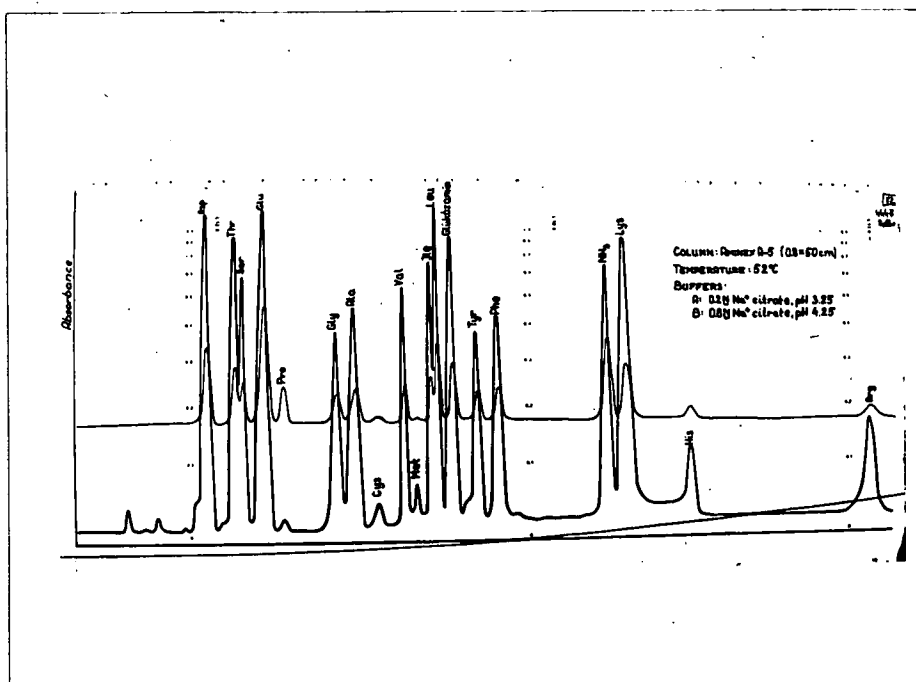
4.3. Aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása

Eluáló pufferrendszerek

Dévényi által javasolt /83/ egyoszlopos két pufferes rendszerrel dolgoztam, ami alkalmas az esszenciális aminosavak, az ammónia és glükózamin elválasztására /9. ábra/.

9. ábra

Szatietin hidrolizátum aminosav-analizise egyoszlopos két pufferes /A+B/ rendszerrel



A két puffer /A és B/ közül az első megegyezik Spackman első pufferével, a második puffer ionkoncentrációját Dévényi 0,2 mol/l-ről 0,8 mol/l-re növelte, így alkalmassá vált a semleges aminosavakon túl a bázikusok elválasztására is. A hisztidin és az arginin eluciója között 60 perc van. Az arginin korábbi elucióját harmadik puffer alkalmazásával /C puffer/ értem el.

Az első puffer váltás a 70. percben /a prolin elució-jakor/, a második pedig a 130. percben /a fenilalanin eluciója után/ volt.

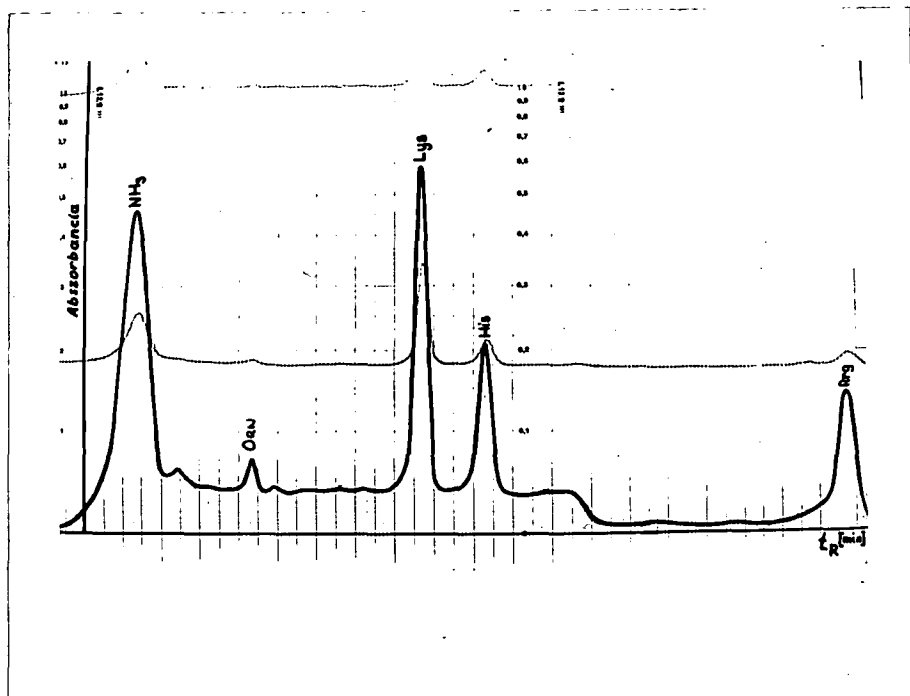
Standard aminosav keverék öt méréséből számított átlagtól való legnagyobb eltérések átlagával jellemezve: a rendszer reprodukálhatósága 2,8 %.

Gondot okozott azonban a galaktózamin-tirozin csucspár elválasztása és ezenkívül egy ismeretlen eredetű csucs, ami az ammónia és a lizin között, a lizinbe olvadva jelentkezett. Megvizsgáltam, hogy a pufferváltás idejének megváltoztatásával elérhetők-e megfelelő R_s értékek. Az ammónia-lizin csucspár esetében a legjobb felbontóképességet csak B pufferes elucióval lehet elérni / $R_{s, 0 \text{ min}} = 2,49$ /. Az átkapcsolási idő növelésével R_s értéke csökken, majd a 96. percben történt átkapcsolásnál $R_{s, 96 \text{ min}} = 0$. Az átkapcsolás további késleltetésével R_s értéke nőni kezd, de az ammónia-lizin sorrend megváltozik, az ammónia "lemarad" a lizinhez viszonyítva.

A megoldás ilymódon viszonylag egyszerű volt: csak B pufferral eluáltam a hidrolizátumot. A kérdéses csucs - mint később azonosítottam, az arginin bomlásterméke: ornitin - "kibujt" a lizin alól. Ez látható a 10. ábrán.

10. ábra

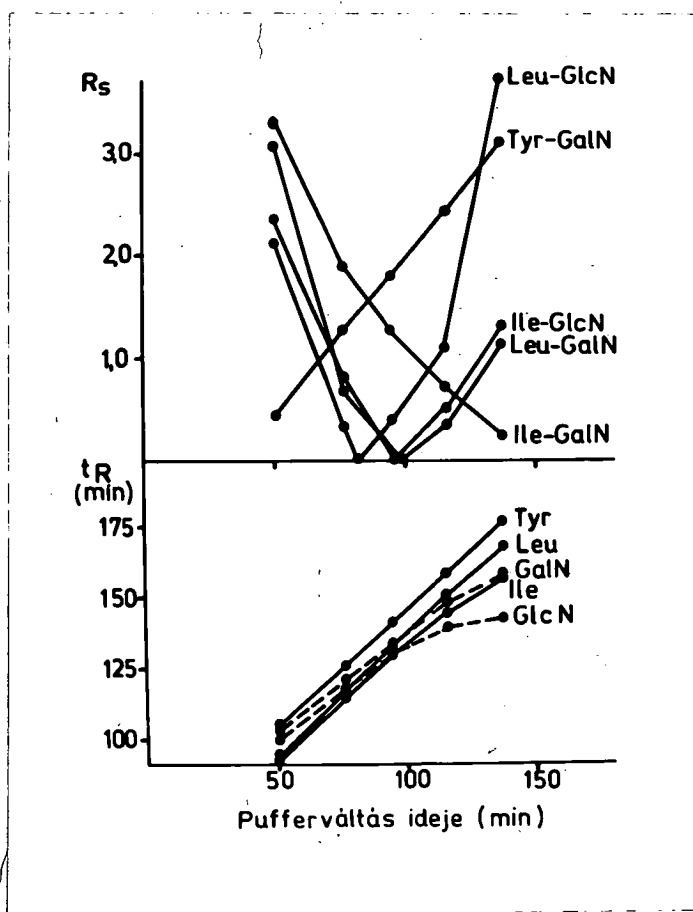
Szatietin hidrolizátum aminosav-analizise egyoszlopos módszerrel és B pufferes elucióval



A cukoraminok és a semleges aminosavak elucióját az átkapcsolási idő függvényében mutatja a 11. ábra. Optimális elválasztást a 65. percben kaptam, ahol a legkisebb felbontóképesség is közel 1,0 volt: $R_{s, Tyr-GalN} = 0,93$. /12. ábra/ /Hasonlóan jó elválasztás kapható a 170. perc után, de ekkor a kromatografálás ideje nagyon megnő, a csúcsok pedig igen laposak lesznek./ A módosított Dévényi-féle egyoszlopos két pufferes rendszerrel lehetővé vált az esszenciális aminosavak és a glükózamin elválasztásán túl a galaktózamin elválasztása is. Ily módon a módszert alkalmassá tettem a szatietnin család /magas szénhidráttartalmu glikoproteinek/ vizsgálatára.

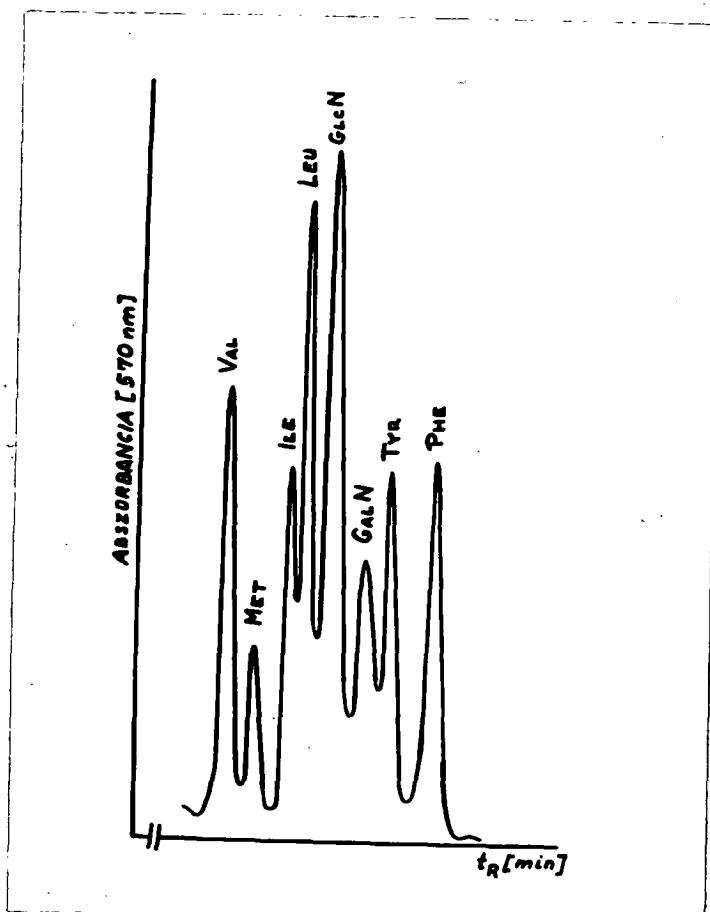
11. ábra

Aminosavak és aminocukrok retenciós ideje ill. a csúcspárok felbontóképessége a pufferváltás idejének függvényében



12. ábra

Szatietin-aktív preparátum hidrolizátumában lévő
cukoraminok elválasztása módosított egyoszlopos, két
pufferes rendszerrel



Ninhidrin oldat

A ninhidrin-oldat készítésekor Moore és munkatársai /69/ által javasolt receptet használva a nitrogén-öblítést nem találtam kielégítőnek, mert a buborékoltatás után hozzáadott ninhidrin az oldás végére halványlilára festette az oldatot. Ezért a nitrogén-öblítés helyett ón /II/-klorid, majd később titán/III/-klorid oldat hozzáadásával redukáltam az oldatban lévő oxidatív ágenseket. Az eredeti recepttel ellentétben a ninhidrint csak ezután adtam az oldathoz. Ilymódon a ninhidrin okozta "alapzajt" - az író logaritmikus skálája /0-tól 2,0-ig/ alapján - 0,1 osztással sikerült csökkenteni. A megnövekedett ón-klorid tartalom némiképp megnövelte a készülékben kiülepedett csapadék mennyiségét, és ez a szerelésre fordított amugy is tetemes időt. Ezt a problémát a James javasolta titán-kloridos "védelemmel" teljesen megoldottam. Optimális megoldásnak így a második receptet találtam. A ninhidrin-oldat "gyengülése" a frissen készült és a kéthónapos oldattal meghatározott 1 μ mol aszparaginsav csucsterületével jellemzem:

	1.d	60.d
1 μ mol Asp területe	37,0	36,5

Két hónapi állás után a ninhidrin oldat "gyengülése" 1,5 % volt.

A számítás menete

A kromatogram értékelését Spackman, Stein és Moore /66/ szerint, az ún. háromszög-módszer felhasználásával végeztem:

$$C = H \cdot W$$

ahol C: a - háromszögnek tekintett - csucs területe

H: a csucs magassága

W: a csucs félértékszélessége

A hidrolizist követő műveletek okozta veszteségek-
ből eredő hibát belső standard /Nle/ használata alapján
korrigáltam. A korrekciós tényező:

$$f_I = \frac{C_I}{C_{I,m}}$$

ahol C_I : a belső standardként használt I aminosav

1 μ moljának standard futtatásakor mért csucs-
területe

$C_{I,m}$: a hidrolizis előtt a mintához adott 1 μ mol I
aminosav csucsterülete a minta kromatogram-
jában

Az aminosavak hidrolizis során bekövetkező degradáció-
jából eredő hibát nulla órára történő extrapolálással
korrigáltam; a $\log m_A$ versus hidrolizis idő függvény
ordináta-metszetét kerestem / m_A : az A aminosav mért
mennyisége μ mol-ban/.

A mért pontokra a görbeillesztést Texas Instruments 59 Programable Calculator Solid State Software "Statistics" programjával végeztem. A további, rutin vizsgálatnál elegendő volt a mintát t ideig hidrolizálni, az aminosav mennyiségét a következő módon határoztam meg:

$$m_{A,C} = m_A^f \cdot f_{Z,A}$$

ahol $m_{A,C}$: az A aminosav korrigált mennyisége, μmol

m_A : $\frac{C_A}{C_{A,St}}$, az A aminosav mért mennyisége, μmol

C_A : az A aminosav csucsterülete a minta kromatogramjában

$C_{A,St}$: 1 μmol A aminosav csucsterülete a standard kromatogramban

$f_{Z,A}$: az A aminosav nulla órára extrapolált és a t órás hidrolízis után meghatározott mennyiségének hányadosa

Hidrolízisek

A 4.3./1. táblázat példaként a parciálisan tisztított szatietin-D minta 6 mol/l sósavas hidrolízis-sor adatait tartalmazza. Az adatok három párhuzamos mérés átlagai, 1 mg szatietin-aktív anyagra vonatkoztatott belső standard-korrigált értékek.

A 6 mol/l sósavas hidrolízis sor alapján nulla órára történő extrapoláció eredményeit a 4.3./2. táblázat tartalmazza.

4.3./1. táblázat

A parciálisan tisztított szatietin-D 6 mol/l sósavas
hidrolízis sor adatai.

hidrolízis idő, h	nmol aminosav/mg minta				
	6	12	24	48	72
Ala	191	200	198	175	157
Arg	71	110	105	95	87
Asp	299	301	299	307	220
Glu	314	428	420	419	320
Gly	173	183	174	161	146
His	49	53	51	50	48
Ile	51	128	106	78	68
Leu	187	199	204	219	194
Lys	278	306	362	652	632
Phe	134	152	134	119	107
Pro	172	213	193	183	179
Ser	162	194	157	154	131
Thr	155	224	219	198	168
Tyr	19	119	120	104	77
Val	75	150	158	160	121

4.3./2. táblázat

A szatietin-aktív anyagok 6 mol/l sósavas hidrolízis sor alapján nulla órára extrapolált aminosavtartalmai

anyagok [*]	nmol aminosav/mg minta					
	1	2	3	4	5	6
Ala	269	216	222	104	147	193
Arg	49	115	31	39	52	81
Asp ^{***}	215	302	105	161	218	282
Glu ^{***}	332	422	145	218	232	356
Gly	100	192	74	114	161	231
His	21	52	12	26	31	28
Ile	96	139	25	65	31	59
Leu	172	280	67	98	81	104
Lys	988	692	296	280	481	834
Phe	98	157	30	49	171	221
Pro	369	213	46	104	111	170
Ser	143	196	82	104	90	162
Thr	141	242	65	135	81	143
Tyr	69	154	19	75	171	221
Val ^{***}	96	156	56	75	78	106

- * 1: parc. tiszt. szatietin
 2: parc. tiszt. szatietin-D
 3: szatietin
 4: szatietin-D
 5: sz.marha szatietin
 6: liba szatietin

***: átlagolt érték /nem 0 órára extrapolált, hanem görbe platón leolvasott érték/

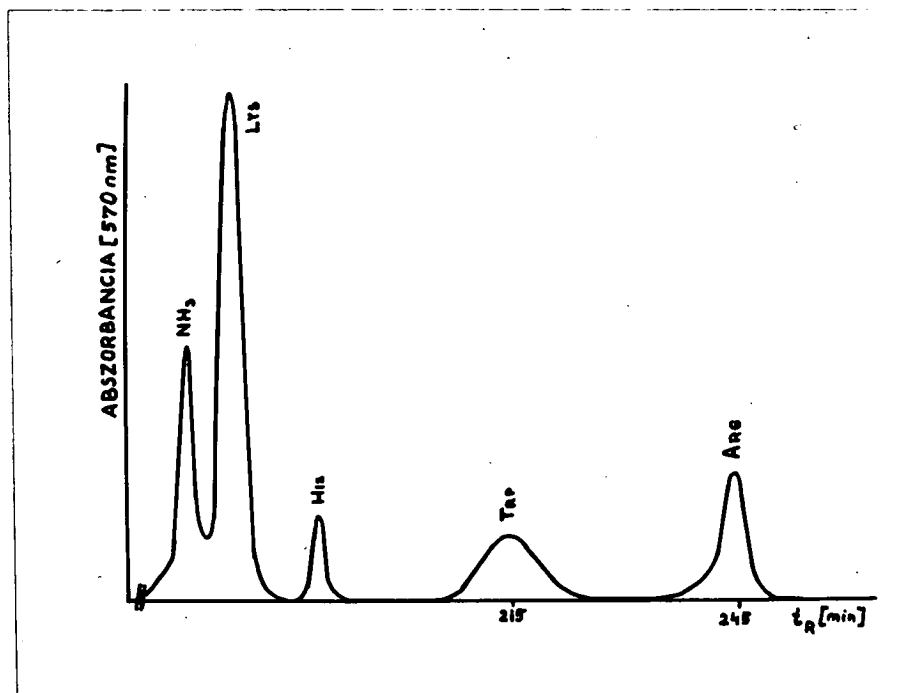
A triptofán meghatározása

A/ Aminosav - analizátorral

A Dévényi által leírt egyoszlopos két pufferes rendszerben a triptofán a 215. percben, az ezt követő arginin pedig a 245. percben eluálódik. Ez viszonylag hosszú analízis idő. Három pufferes rendszer alkalmazásakor az arginin retenciós ideje jelentősen csökken, ezzel szemben azonban a triptofáné megnő, eluciós sorrendjük felcserélődik. A viszonylag hosszú eluciós idő mellett sokkal nagyobb problémát jelentett az, hogy a triptofán csúcsa nagyon széles és lapos, nehezen számítható volt. /13. ábra/ Ezért új pufferrendszert dolgoztam ki a Dévényi által leírt pufferrendszer és Spackman által a két oszlopos módszernél a bázikus aminosavak elválasztására használt puffer /nálam: D puffer/ felhasználásával. A B puffernek viszonylag alacsony a pH-ja /4,25/ és magas a Na^+ koncentrációja /0,8 mol/l/, a D puffernek pedig fordítva, a pH-ja viszonylag magas /5,25/ és a Na^+ koncentrációja alacsony /0,35 mol/l/. A tirozin után B pufferről D-re kapcsolva az utolsónak eluálódó csúcs a triptofán elég keskeny, jól számítható /14. ábra/.

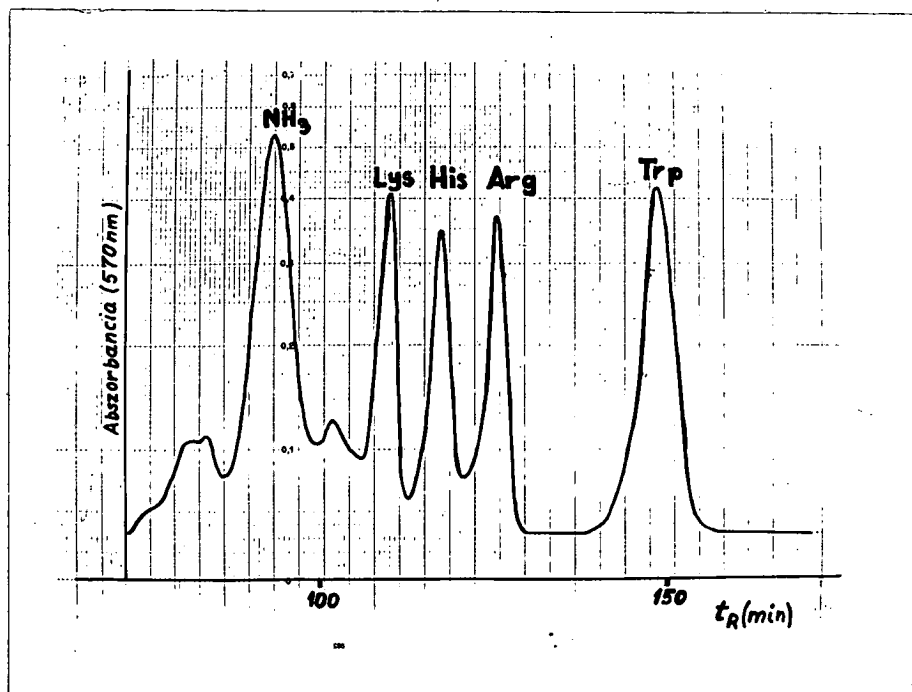
13. ábra

Bázikus aminosavak elválasztása egy oszlopos két pufferes rendszer alkalmazásával



14. ábra

Bázikus aminosavak elválasztása A, B és D puffer alkalmazásával



A 4.3./3. táblázat példaként a parciálisan tisztított szatietin-D minta 4 mol/l nátrium-hidroxidos hidrolizis sor adatait tartalmazza.

4.3./3. táblázat

A parciálisan tisztított szatietin-D minta 4 mol/l nátrium-hidroxidos hidrolizis sor adatai

hidrolizis idő, h	3	5	10	15	20	0
<u>nmol triptofán</u> mg minta	27	32	54	38	32	88

A 4 mol/l nátrium-hidroxidos hidrolizissor alapján nulla órára történő extrapoláció eredményeit tartalmazza a 4.3./4. táblázat első oszlopa

4.3./4. táblázat

A szatietin-aktív anyagok 4 mol/l nátrium-hidroxidos hidrolizis sor alapján nulla órára extrapolált értékei /A/, a spektrofotometriás meghatározás adatai /B/, a két meghatározás relatív eltérése

	<u>nmol triptofán/mg minta</u>		<u> A - S </u>
	A	S	A
parc. tiszt. szatietin	110	91	0,175
parc. tiszt. szatietin-D	88	80	0,089
szatietin	97	n.m.	-
szatietin-D	69	68	0,012
sz.marha szatietin	128	119	0,70
liba szatietin	79	78	0,011

n.m.: nem meghatározott

B/ Spektrofotometriásan

Edelhoch a tirozin és a triptofán 280 és 288 nm-en mért moláris extrinkciós koeficiensei alapján a következő egyenleteket állította fel egy adott fehérje triptofán tartalmának meghatározására:

$$E_{280} = 5690 \text{ Trp} + 1280 \text{ Tyr}$$

$$E_{288} = 4815 \text{ Trp} + 385 \text{ Tyr}$$

ahol E_{280} és E_{288} : a fehérje 280 és 288 nm-en mért moláris extinkciós koeficiense

Trp és Tyr : a vizsgált fehérjemolekulában lévő triptofán és tirozin molekulák száma

A két egyenletből:

$$\text{Trp} = \frac{E_{288}}{3103} - \frac{E_{280}}{10318}$$

Tekintettel arra, hogy az általam vizsgált hat mintából csak kettő tekinthető homogénnek /a többi még szérumfehérjékkel szennyezett/, nem moláris extinkciós koeficienssel, hanem az 1 mg/ml koncentrációnál mért extinkcióval $/E^{\text{mg/ml}}/$ számoltam, majd ebből határoztam meg a minták triptofán tartalmát $\mu\text{mol/mg}$ -ban. Az általam számított egyenletek:

$$E_{280}^{\text{mg/ml}} = 28,28 \text{ Trp} + 6,74 \text{ Tyr}$$

$$E_{288}^{\text{mg/ml}} = 23,04 \text{ Trp} + 1,30 \text{ Tyr}$$

és a két egyenletből:

$$\text{Trp} = \frac{E_{288}^{\text{mg/ml}}}{17,59} - \frac{E_{280}^{\text{mg/ml}}}{91,17}$$

Edelhoc 6 mol/l guandin-hidrokloridban denaturlalta a fehérje mintákat. A szatietin-aktív preparátumok azonban ilyen körülmények között nem adtak optikailag tiszta oldatot. Ezért az SDS gélelektroforézis mintaoldásakor sikeresen alkalmazott 0,07 mol/l SDS oldattal dolgoztam, amiben a minták tökéletesen oldódtak.

A vizsgált szatietin-aktív anyagok 280 és 288 nm-en mért elnyeléseikből meghatározott triptofántartalmat a 4.3./4. táblázat második oszlopa /S/ tartalmazza. A két módszerrel mért adatok relatív eltérését a táblázat harmadik oszlopa tartalmazza $\frac{|A - S|}{A}$.

Jelentős eltérést /17,5 rel %-t/ a parciálisan tisztított szatietin esetében kaptam.

A metánszulfonsavas hidrolízis után egyik anyagnál sem sikerült triptofánt detektálnom.

Kéntartalmu aminosavak meghatározása

A/ A perhangyasavas oxidáció eredményeit a 4.3./5. táblázatban foglaltam össze.

4.3./5. táblázat

A perhangyasavas oxidációt követő meghatározás
eredményei

	nmol aminosav/mg minta	
	CysSO ₃ H	MetO ₂
parc. tiszt. szatietin	25	31
parc. tiszt. szatietin-D	106	57
szatietin	22	9
szatietin-D	57	36
sz.marha szatietin	47	24
liba szatietin	67	36

B/ Karboximetil-ciszteint egyik anyagból sem lehetett előállítani, azaz, az anyagok nem tartalmaznak ciszteint.

Aminocukrok meghatározása

A 4.3./6. táblázat példaként a parciálisan tisztított szatietin-D minta 4 mol/l sósavas hidrolízis sor adatait tartalmazza.

4.3./6. táblázat

A parciálisan tisztított szatietin-D 4 mol/l sósavas hidrolizis sor adatai

hidr. idő, h	nmol aminocukor/mg minta					
	6	8	13	20	24	0
GlcN	238	281	300	276	263	349
GalN	54	64	68	62	59	80

A 4 mol/l sósavas hidrolizis sor alapján nulla órára történő extrapoláció eredményeit foglaltam össze a 4.3./7. táblázatban.

4.3./7. táblázat

A szatietin-aktív anyagok 4 mol/l sósavas hidrolizis sor alapján nulla órára extrapolált értékei

	nmol aminocukor/mg minta	
	GlcN	GalN
parc. tiszt. szatietin	288	49
parc. tiszt. szatietin-D	349	80
szatietin	312	53
szatietin-D	369	87
sz.marha szatietin	233	58
liba szatietin	344	80

A 4.3./8. táblázatban a parciálisan tisztított szatietin aminosav komponenseinek koncentrációit nmol/mg és $\mu\text{g}/\text{mg}$ mértékegységekben és az utóbbi alapján meghatározott fehérjetartalmat foglaltam össze.

4.3./8. táblázat

A parciálisan tisztított szatietin aminosav-összetétele, aminocukor-tartalma és fehérjetartalma

	aminosav koncentráció	
	nmol/mg	$\mu\text{g}/\text{mg}$
Ala	269	19,1
Arg	49	7,6
Asp	215	24,7
/Cys/2	12	5,8
Glu	332	42,8
Gly	100	5,7
His	21	2,8
Ile	96	10,8
Leu	172	19,5
Lys	988	126,4
Met	31	5,5
Phe	98	14,5
Pro	369	35,8
Ser	143	12,5
Thr	141	14,3
Trp	110	20,5
Trp ^{**}	91	16,9
Tyr	69	11,3
Val	96	9,4
GalN	49	8,6
GlcN	288	50,2
fehérjetartalom /s %/		38,9

* Edelhooh szerint meghatározva

A 4.3./9. táblázatban a parciálisan tisztított szatietin-D aminosav komponenseinek koncentrációit nmol/mg és µg/mg mértékegységekben és az utóbbi alapján meghatározott fehérjetartalmat foglaltam össze.

4.3./9. táblázat

A parciálisan tisztított szatietin-D aminosav-összetétele, aminocukor-tartalma és fehérjetartalma

	aminosav koncentráció	
	nmol/mg	µg/mg
Ala	216	15,2
Arg	115	17,9
Asp	302	34,7
/Cys/2	53	11,7
Glu	422	54,5
Gly	192	10,9
His	52	7,1
Ile	139	15,7
Leu	280	31,6
Lys	692	88,6
Met	57	7,5
Phe	157	23,1
Pro	213	20,6
Ser	196	17,0
Thr	242	24,4
Trp	88	16,4
Trp*	80	15,0
Tyr	154	25,1
Val	156	15,2
GalN	80	12,9
GlcN	349	56,1
fehérjetartalom /s %/		43,7

A 4.3./10. táblázatban a szatietin aminosav komponenseinek koncentrációit nmol/mg és $\mu\text{g}/\text{mg}$ mértékegységekben, a kerekített egész értékeit, az ebből számított peptidrész relatív molekulatömegét és a fehérjetartalmat foglaltam össze.

4.3./10. táblázat

A szatietin aminosav-összetétele, az aminosavak kerekített egész értékei, aminocukor-tartalma, fehérjetartalma és a peptidrész relatív molekulatömege

	aminosav koncentráció		kerekített egész
	nmol/mg	$\mu\text{g}/\text{mg}$	
Ala	222	15,8	14
Arg	31	4,9	2
Asp	105	12,1	6
/Cys/ ₂	11	2,4	1
Glu	145	18,7	9
Gly	74	4,2	4
His	12	1,6	1
Ile	25	2,8	2
Leu	67	7,5	4
Lys	296	37,9	19
Met	9	1,2	1
Phe	30	4,4	2
Pro	46	4,5	3
Ser	82	7,1	5
Thr	65	6,6	4
Trp	97	20,5	9
Tyr	19	3,1	1
Val	56	5,5	3
GalN	53	8,6	4
GlcN	312	50,2	26
peptidrész relatív molekulatömege			10539
fehérjetartalom /s %/		16,1	

A 4.3./11. táblázatban a szatietin-D aminosav komponenseinek koncentrációit nmol/mg és µg/mg mértékegységekben, a kerekített egész értékeit, az ebből számított peptidrész relatív molekulatömegét és a fehérjetartalmat foglaltam össze.

4.3./11. táblázat

A szatietin-D aminosav-összetétele, az aminosavak kerekített egész értékei, aminocukor-tartalma, fehérjetartalma és a peptidrész relatív molekulatömege

	aminosav koncentráció		kerekített
	nmol/mg	µg/mkg	egész
Ala	104	7,4	4
Arg	39	6,1	2
Asp	161	18,5	6
/Cys/ ₂	29	6,3	1
Glu	218	28,1	8
Gly	114	6,5	4
His	26	3,5	1
Ile	65	7,3	3
Leu	98	11,1	4
Lys	280	35,8	11
Met	36	4,1	1
Phe	49	7,2	2
Pro	104	10,0	4
Ser	104	9,0	4
Thr	135	13,6	5
Trp	69	12,7	3
Trp [⌘]	68	12,7	3
Tyr	75	12,2	3
Val	75	7,4	3
GalN	87	14,0	3
GlcN	369	59,4	14
peptidrész relatív molekulatömege			8111
fehérjetartalom /s %/		20,7	

⌘ Edelhoch szer

írozva

A 4.3./12. táblázatban a szarvasmarha szatietin aminosavkomponenseinek koncentrációit nmol/mg és µg/mg mértékegységekben és az utóbbi alapján meghatározott fehérjetartalmat foglaltam össze.

4.3./12. táblázat

A szarvasmarha szatietin aminosav-összetétele, aminocukor-tartalma és fehérjetartalma

	aminosav koncentráció	
	nmol/mg	µg/mg
Ala	147	10,4
Arg	52	8,1
Asp	218	25,0
/Cys/₂	24	5,2
Glu	232	30,0
Gly	161	9,2
His	31	4,2
Ile	31	3,4
Leu	81	9,1
Lys	481	61,6
Met	24	3,1
Phe	171	25,0
Pro	111	10,8
Ser	90	7,8
Thr	81	8,1
Trp	128	23,8
Trp*	119	22,1
Tyr	171	27,8
Val	78	7,6
GalN	58	9,3
GlcN	233	37,5
fehérjetartalom /s %/		28,0

* Edelhooh szerint meghatározva

A 4.3./13. táblázatban a liba szatietin aminosav-komponenseinek koncentrációit nmol/mg és µg/mg mértékegységekben és az utóbbi alapján meghatározott fehérjetartalmat foglaltam össze.

4.3./13. táblázat

A liba szatietin aminosav-összetétele, aminocukor-tartalma és fehérjetartalma

	aminosav koncentráció	
	nmol/mg	µg/mg
Ala	193	13,7
Arg	81	12,6
Asp	282	32,4
/Cys/₂	34	7,4
Glu	356	45,9
Gly	231	13,1
His	28	3,8
Ile	59	6,6
Leu	104	11,7
Lys	834	106,8
Met	36	4,7
Phe	221	32,5
Pro	170	16,5
Ser	162	14,1
Thr	143	14,4
Trp	79	14,5
Trp*	78	14,5
Tyr	221	36,0
Val	106	10,3
GalN	80	2,8
GlcN	344	12,3
fehérjetartalom /s %/		39,7

* Edelhooh szerint meghatározva

4.4. Végcsoport vizsgálatok

N-terminális aminosavak meghatározása

A vizsgálatokat a szatietin és a szatietin-D anyagokon végeztem el.

Mikro-poliamid rétegen a danzil aminosavak közül a danzil-aszparaginsav és danzil-glutaminsav, a danzil-treonin és danzil-szerin és a danzil-arginin és ϵ -danzil-lizin párok elválasztása nem volt kielégítő. Szilikagél rétegen kerestem a megoldást. /A standard danzil-aminosavak között nem szereplő ϵ -danzil-lizint Gln-Lys-Pro-OH-ból állítottam elő./ Öt, merőben új oldószerkeletet találtam, amelyek alkalmasak a fenti problémák megoldására. A danzil-aminosavak retenciós faktorkiértékeit a 4.4./1. táblázatba foglaltam.

Mind a két vizsgált mintánál csupán az O-danzil-tirozin és az ϵ -danzil-lizin helyén volt folt. A szilikagél rétegen n-butanol - metanol - 25% ammónia - víz /20:2:1:4/ oldószerkelettel végzett vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy csak ϵ -danzil-lizin volt a mintákban, danzil-arginin nem. Ez azt jelenti, hogy az anyagok N-terminális aminosavai nem szabadok.

4.4./1. táblázat

Danzil-aminosavak retenciós faktorai szilikagélen különböző oldószerelegyekkel

DANS-aminosavak	R _f x 100				
	oldószerelegyek [*]				
	1	2	3	4	5
Ala	71	68	47	75	57
Arg	32	23	22	46	1
Asp	41	5	6	29	15
bis/Cys/2	42	24	12	43	12
Glu	62	10	6	31	24
Gly	64	58	38	70	43
His	18	28	21	56	2
Ile	82	77	58	79	72
Leu	81	71	51	77	67
bis-Lys	76	82	58	81	57
ε-Lys	36	21	14	42	2
Met	73	75	53	79	63
Phe	75	73	50	77	66
Pro	65	52	31	62	72
Ser	63	47	26	66	20
Thr	66	58	32	73	26
Trp	76	52	40	72	47
bis-Tyr	76	64	43	74	32
Val	79	76	54	76	68

* 1: izo-propanol - viz /9:1/

2: toluol - etanol - 25% ammónia /6:10:0,5/

3: n-butanol - metanol - 25% ammónia - viz /20:2:1:4/

4: t-butanol - metanol - 25% ammónia - viz /20:2:1:4/

5: benzol - metanol - ecetsav /85:10.5/

C-terminális aminosavak meghatározása

A vizsgálatokat a szatietin és a szatietin-D mintákkal végeztem el.

A szatietin minta karboxipeptidáz A-val történő emésztése során csak a peptidekre jellemző, széles, alakatlan csucsot kaptam, szabad aminosavra jellemzőt nem.

A szatietin-D karboxipeptidáz A-val történő hidrolizise során felszabadult aminosavakat a 4.4./2. táblázat tartalmazza. Tekintettel arra, hogy az alanin és a metionin hasonló sebességgel szabadul fel, egyértelműen nem dönthető el, hogy melyikük a C-terminális aminosav.

4.4./2. táblázat

A szatietin-D karboxipeptidáz A-val felszabadított aminosavai

hidrol.idő, min.	nmol aminosav/nmol anyag		
	5	10	20
Ala	0,187	0,198	0,334
Gly	0,104	0,127	0,200
Met	0,0854	0,125	0,376

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE,
DISZKUSSZIÓ

A disszertációmban leírt eredményeim alapján az alábbi konkluziókat emelném ki.

A biuret reakcióval /4.1./1. táblázat/ és a Lowry-féle fehérjemeghatározási módszerrel /4.1./2 táblázat/ kapott fehérjetartalom értékek közötti eltérés oka részben az, hogy a szatietin-aktív molekulákban lévő tirozin és triptofán koncentráció eltér a - standardként használt - bovin szérum albumin tirozin és triptofán koncentrációjától, más részben pedig - és feltehetően ez a jelentősebb hatásu - a preparátumokban lévő szénhidrát jelenléte zavarja a Lowry meghatározást. A biuret reakció kevésbé összetétel-függő, eredményei jól egyeznek az aminosav-analízis útján kapott értékekkel /lásd 5./1. táblázat/. Tehát a szatietin család gyors, rutinszerű fehérjetartalom meghatározására alkalmas a biuret-reakció.

5./1. táblázat

Fehérjetartalom meghatározása aminosav-analízis alapján /A/ és biuret reakcióval /B/, a két módszerrel mért adatok relatív eltérése

	fehérjetartalom, s %		A - B
	A	B	A
parc. tiszt. szatietin	38,9	40,8	0,049
parc. tiszt. szatietin-D	43,7	40,4	0,076
szatietin	16,1	15,7 [*]	0,025
szatietin-D	20,7	20,5	0,010
sz.marha szatietin	28,0	27,9	0,004
liba szatietin	39,7	37,5	0,055

* Lowry módszerével meghatározva

A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok során szilikagél /4.2./1., 2. és 3. táblázat/ és ioncserélő rétegen /7. és 8. ábra/ optimalizáltam az aminosavak elválasztását, figyelembe véve a vizsgált szatietin-aktív anyagok sajátosságait, nevezetesen az aminocukrok jelenlétét, továbbá a magas savas és bázikus aminosav-tartalmat. Szilikagél vékonyrétegen tulfuttatásos módszerrel kombinált kétdimenziós technikával elválasztottam az összes esszenciális aminosavakat és a glükózamint. A nagyon kis mennyiségben jelenlévő cisztinen és metioninon kívül minden mintá-

ban esszenciális aminosav és a glükózamin jelenlétét sikerült kimutatnom /4.2./4. táblázat/.

Az aminosav-analizátorral történő analíziseknél a pufferváltás idejének optimalizálásával a Dévényi által leírt egyoszlopos két pufferes rendszert alkalmassá tettem az összes esszenciális aminosav mellett a glükózamin és a galaktózamin elválasztására is.

Moore és munkatársai által javasolt és James által módosított ninhidrin oldat készítésénél azt találtam, hogy a nitrogén buborékoltatás kisebb hatásfokkal távolítja el az oldatból az oxidatív ágenseket, mint a titán/III/-klorid oldat, amit a ninhidrin hozzáadása előtt - megnövelt mennyiségben - adtam az oldathoz.

A glikoproteinek fizikai és kémiai anomális viselkedése alapján a fehérjékhez viszonyítva a vizsgált anyagok kis stabilitására számithattam. A 6 mol/l sósavas hidrolízis sor eredményei /4.3./1. táblázat/ azonban azt mutatják, hogy a szatietin-aktív anyagok meglepően stabilisak, az aminosavak nulla órára történő extrapolációjához körülbelül ugyanannyi ideig tartó hidrolízis /24, 48 és 72 órás/ szükséges, mint általában a fehérjékhez.

A Dévényi által leírt két pufferes rendszer alkalmas az összesesszenciális aminosav mellett a triptofán meghatározására is, de mint ahogy ezt már említettem, a triptofán csúcsa "szétterülő", területe nehezen szá-

mitható. Az általam alkalmazott kromatografálással kapott triptofáncsucs keskeny, területe jól számítható. /13. ábra/.

Edelhoch módosított spektrofotometriás módszerével és a nátrium-hidroxidos hidrolizist követő aminosav-analizissel nyert triptofán mennyiségei viszonylag jó egyezést mutatnak /4.3./4. táblázat/. Glikoproteinek esetében az eltérés oka a szénhidráttartalom szférikus árnyékoló hatásából eredő hiba lehet. A módszer alkalmas a glikoproteinek triptofántartalmának gyors, félkvantitatív meghatározására.

Metánszulfonsavas hidrolizist követő aminosav-analizissel a vizsgált mintákból egyáltalán nem sikerült triptofánt detektálni. A szatietin-aktív minták vizsgálatára ez a - fehérjeanalitikában egyébként sikeresen és széles körben alkalmazott - módszer nem alkalmas.

A preparátumok egyikében sem sikerült karboximetilezéssel - reaktív SH-csoportot tartalmazó - ciszteint detektálni. A ditiotreitolos redukciót követő SDS poliakrilamid gél elektroforézissel /85/ azonban mind a szatietin, mind a szatietin-D ugyanazt a képet mutatta, mint redukció nélkül, ami azt jelenti, hogy vagy csak egy peptidlánc van a molekulákban és azok másodlagos szerkezetét stabilizálja az S-S kötés, vagy az esetlegesen jelenlévő több peptidlánc szénhidrátvázon keresztül is kapcsolódik.

Az aminocukrok meghatározásánál alkalmazott 4 mol/l sósavas hidrolízis sor adatai /4.3./7. táblázat/ is a molekulák viszonylag nagy stabilitását mutatják. Összehasonlítva a csimpánz α_1 -savas-glikoprotein 4 mol/l sósavas hidrolízis sorával /84/, a szatietin-aktív molekulák mért aminocukor-tartalmai a 13 órás hidrolízis után magasabbak, mint a 8 órás hidrolízis utániak, az α_1 -savas-glikoprotein glükózamin-tartalmának legmagasabb értékét 6 órás, a galaktózamin-tartalmának legmagasabb értékét 4 órás hidrolízis után kapták - amely rövid hidrolízis idők általában jellemzők az irodalomban található glikoproteinek aminocukor meghatározásaira.

A vizsgált minták aminosav-összetételében alapvetően hasonló a magas lizin-, aszparaginsav- és glutaminsav-tartalom. Mindegyik preparátumnál magas a glükózamin-tartalom is. Különbség azonban, hogy a humán szatietin az előzőeken túlmenően alanint, a két állati eredetű szatietin-aktív anyag pedig tirozint, fenilalanint és glicint tartalmaz nagyobb mennyiségben. A szatietin-D a magas lizin-, aszparaginsav- és glutaminsav-tartalom mellett egyéb esszenciális aminosavakat egymáshoz viszonyítva közel azonos, kis mennyiségben tartalmaz.

A szatietin utolsó tisztítási lépése során első sorban a lizin, a prolin és a leucin mennyisége, a

szatietin-D esetében viszont viszonylag egyenletesen, minden aminosav mennyisége csökkent. A szatietin-aktív anyagok további hasonlósága, hogy mindegyiknek extrém alacsony a fehérjetartalma. Az automata aminosav-analizátorral kapott adatokból számított fehérjetartalom jól egyezik a biuret reakcióval meghatározott értékekkel /5.1. táblázat/. A peptidrész - a kerekített egész értékek alapján kiszámított - relatív molekulatömege és a fehérjetartalom alapján meghatározott teljes relatív molekulatömeg a szatietin esetében 65.500, a szatietin-D esetében pedig 39.200-nak adódik. Az SDS poliakrilamid gél elektroforézissel meghatározott relatív molekulatömeg értékek 65.000 illetve 43.000 /85/. A két módszerrel kapott adatok jól egyeznek.

A parciálisan tisztított és a homogén szatietin fehérjetartalma közti különbség 22,8%, ez az érték a szatietin-D esetében 23%. Figyelembe véve azonban azt, hogy az emésztéssel tisztított anyag, a szatietin-D poliakrilamid gél elektroforézissel mért szabad elektroforetikus mozgékonyága nagyobb, mint a parciálisan tisztított szatietin-D-jé, és a sáv kiszélesedik, képe torzul, azt feltételezhetjük, hogy az emésztés során a peptidláncból aminosavak hasadhatnak ki - új szabad töltéseket hozva létre -, az egész molekula relatív molekulatömegéhez képest azonban elhanyagolható mennyiségben, ugyanis az emésztéses tisztítás során a relatív

molekulatömeg mérhető módon nem változott. Ezért a parciálisan tisztított szatietin-D fehérjeszennyezettsége 10 és 20 % között lehet. 40.000-65.000 relatív molekulatömegű endogén anyagok esetében az ilyen mértékű szennyezettség nem tekinthető nagynak, aminosav-analitika szempontjából azonban - tekintve a vizsgált molekulák alacsony fehérjetartalmát - már számottevő mennyiség.

A kémialilag homogénnek tekinthető anyagok N-terminális vizsgálati eredményeik azt eredményezték, hogy az anyagok N-terminális aminosavai nem szabadok, és ez az anyagok hasonlóságáról alkotott képünket gazdagíthatja.

A homogén anyagok C-terminális aminosav vizsgálati során csak a szatietin-D esetében kaptam szabad aminosavakat. Tekintettel azonban arra, hogy a detektált alanin és metionin azonos sebességgel szabadul fel, a peptid C-terminális aminosavának egyértelmű meghatározásához további vizsgálatokra van szükség.

Az elért eredmények jó alapot biztosítanak a szatietin-aktív anyagok kémiai szerkezetének megismeréséhez és ezeknek az eredményeknek ismeretében ezek az új, természetes eredetű anorexiás hatású preparátumok elsődlegesen jellemezhetők és tulajdonságai leírhatók. A munkám során nyert adatok és adaptált módszerek alapvető fontosságuk a szatietin-aktív anyagok enzimátikus hasításához, az így nyert - esetlegesen biológiailag aktív - peptid ill. glikopeptin fragmensek jellemzéséhez és teljes kémiai elemzéséhez is.

ÖSSZEFOGLALÁS

Humán, szarvasmarha és liba szérumból előállított szatietin-aktív anyagok peptidrészének aminosav-analizisével foglalkoztam. Munkám kettős célt követett: egyrészt a fehérjeanalitikában ismert módszereket adaptáljam, vagyis alkalmassá tegyem az egyszerű fehérjék tulajdonságaitól alapvetően eltérő /extrém magas, 60-70% szénhidráttartalmu/ szatietin-aktív glikoproteinek vizsgálatára, másrészt ezen új anyagok peptidrészének minőségi és mennyiségi aminosav-összetételét megállapítsam.

A vizsgált szatietin-aktív minták összfehérje tartalmát biuret reakcióval, Lowry-féle meghatározással és automata aminosav-analizis alapján kapott adatokból határoztam meg. A biuret reakcióval és az aminosav-analizis útján nyert adatok jó egyezést mutattak, és alkalmasnak bizonyultak a szatietin-aktív anyagok vizsgálatára, míg a Lowry-féle meghatározást a magas szénhidráttartalom nagymértékben zavarta.

A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok során szilikagél rétegen a túlfuttatásos kromatográfiát kombinálva a kétdimenziós technikával, olyan módszert dolgoztam ki, amelyik - figyelembe véve a szatietin-aktív anyagok sajátosságait: az aminocukrok jelenlétét, továbbá a magas

savas és bázikus aminosavtartalmat és az ezekből eredő helyenkénti túlterhelést - alkalmas az összes aminosav és a glükózamin elválasztására. Fixion 50X8 kationcserélő vékonyrétegen optimalizáltam a savas illetve a bázikus aminosavak és a cukoraminok elválasztását.

Az automata aminosav-analízisnél a Dévényi által leírt egyoszlopos két pufferes rendszert alkalmassá tettem az esszenciális aminosavakon kívül a glükózamin és a galaktózamin elválasztására is.

Edelhoch spektrofotometriás triptofán meghatározási módszerét módosítottam és alkalmassá tettem a szatietin-aktiv minták triptofántartalmának meghatározására.

A vizsgált preparátumok hasonló tulajdonságai: extrém alacsony fehérjetartalom, magas lizin-, aszparaginsav, glutaminsav- és glükózamintartalom, alacsony cisztin- és metionintartalom, továbbá a homogén anyagok csak egy S-S kötést tartalmaznak és maszkírozott N-terminális aminosavuk van.

A vizsgált minták eltérő tulajdonságai: a szatietin, a lizinen, aszparaginsavon és glutaminsavon kívül nagy mennyiségben tartalmaz alanint, a két állati eredetű szatietin-aktiv preparátum pedig tirozint, fenilalanint és glicint; a szatietin-D - a lizint, aszparaginsavat és glutaminsavat nem tekintve - az aminosavakat megközelítően azonos mennyiségben tartalmazza.

Az aminosav-analízis alapján számított relatív molekulatömegek jó egyezést mutatnak az SDS poliakrilamid gélelektroforézissel kapott értékekkel.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Elődi, P. /1980/ Biokémia, Akadémiai Kiadó, Budapest.
2. Knoll, J. /1979/ Physiol. Behav. 23, 497.
3. Knoll, J. /1982/ in: Advances in Pharmacology and Therapeutics II. Vol. I./Szerk.: Yoshida, H., Hagihara, Y. és Ebashi, S./ Pergamon Press, Oxford, New York, p. 147.
4. Knoll, J. /1979-1980/ Orvostudomány 30-31, 351.
5. Knoll, J. /1982/ in: Regulatory Peptides: From Molecular Biology to Function /Szerk.: Costa, E., Trabucchi, M./ Raven Press, New York, p. 501.
6. Knoll, J. /1984/ J. Neural Transmission 59., 163-194.
7. Nagy, J., Kalász, H., Knoll, J. /1983/ in: Chromatography and Mass Spectrometry in Biomedical Sciences, 2 /Szerk.: Frigerio, A./ Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam, p. 421.
8. Nagy, J., Kalász, H., Knoll, J. /1982/ Pol. J. Pharmacol. Pharm. 34., 47-52.
9. Riegel, E. /1914/ Z. Anal. Chem. 53, 242.
10. Weichselbaum, T.E. /1946/ Am. J. Clin. Pathol. 16, Tech. Sect. 10, 40.
11. Henry, R. J., Sobel, C., Berkman, S. /1957/ Anal. Chem. 29, 1491.

12. Strickland, R.D., Freeman, M.L., Gurule, F.T. /1961/
Anal.Chem. 33, 545.
13. Goa, J. /1953/ Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5,
218.
14. Wu, H. /1922/ J. Biol. Chem. 51, 33.
15. Folin, O., Ciocalteu, V. /1927/ J. Biol. Chem.
73, 627.
16. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. Farr, A.L.,
Randall, R.J. /1951/ J. Biol. Chem. 193, 265.
17. Peterson /1977/ Anal Biochem. 83, 346.
18. Dévényi, T., Gergely, J. /1971/ Aminosavak, pep-
tidek, fehérjék, Medicina Könyvkiadó. Budapest,
p. 185.
19. Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore S. /1958/
Anal. Chem. 30, 1190.
20. Moore, S., Stein, W.H. /1951/ J. Biol. Chem. 192,
663.
21. Smith, E.L., Stockell, A.J. /1954/ J. Biol. Chem.
207, 501.
22. Hirs, C.H.W., Stein, W.H., Moore, S. /1954/ J. Biol.
Chem. 211, 941.
23. Thompson, E.Y. P. /1954/ Biochem. Biophys. Acta
15, 440.
24. Hirs, CH.W. /1960/ J. Biol. Chem. 235, 625.
25. Mendez, E., Grubb, A.O., Lopez, C., Frangione, B.,
Franklin, E.C. /1982/ Arch. Biochem Biophys. 213,
240.

26. Matsuhara, H., Sasaki, R.M. /1969/ Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 175.
27. Eveleigh, J.W., Winter, G.D. /1970/ in: Protein Sequence Determination /Szerk.: Needleman, S.B./ Springer-Verlag, p. 92.
28. Tsugita, A., Scheffler, J.J. /1982/ Proc. Japan Acad. 58, Ser. B. 1
29. Westall, F., Hesser, H. /1974/ Anal. Biochem 61, 610.
30. Sanger, F. /1949/ Biochem J. 44, 126.
31. Hirs, C.H.W. /1956/ J. Biol. Chem. 219, 611.
32. Ryle, A.P. Sanger, F., Smith, L.F., Kitai R. /1955/ Biochem. J. 60, 541.
33. Schram, E., Moore, S., Bigwood, E.J. /1954/ Biochem. J. 57, 33.
34. Pierce, J. G. /1955/ J. Am. Chem. Soc. 77, 184.
35. Crestfield, A.M., Moore, S., Stein, W.H. /1958/ J. Biol. Chem. 238, 622.
36. Cleland, W.W. /1964/ Biochemistry 3, 480.
37. Inglis, A.S., Liu, T.-Y. /1970/ J. Biol. Chem. 254, 112.
38. Edelhoch, H. /1967/ Biochemistry, 6, 1948.
39. Dévényi, T., Bati, J., Fábán, F. /1971/ Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 133.
40. Simpson, J.R., Neuberger, M.R., Liu, T.-Y. /1976/ J. Biol. Chem. 251, 1936

41. Penke, B., Ferenczi, R., Kovács K. /1974/ Anal. Biochem. 60, 45.
42. Rees, M. W. /1946/ Biochem. J. 40, 632.
43. Carraway, K.L., Koschland, D.E. /1972/ Methods in Enzymol. 25, 616.
44. Wilcox, P.E. /1967/ Methods in Enzymol. 11, 63.
45. Soby, L.M., Johnson, P. /1981/ Anal. Biochem. 113, 149.
46. Tower, D.B. /1967/ Methods in Enzymol. 11, 76.
47. Kim, J. H., Shome, B., Liao, T.H., Pierce, J.G. /1967/ Anal. Biochem. 20, 258.
48. Madden, D.E., Apenfels, W.F., Mathens, R.A., Newsom, A.E. /1982/ J. Chromatogr. 248, 476.
49. Mutoh, S., Funakoshi, I., Ui, N., Yamashina, I. /1980/ Arch. Biochem. Biophys. 202, 137.
50. Kugamai, I., Yamasaki, M., Ui, N. /1981/ Biochem. Biophys. Acta 659, 334.
51. Hunt, J.S., Macdonald, P.R., McGiven, A.R. /1982/ Biochem. Biophys. Res. Comm. 104, 1025.
52. Horton, D., Tanimura, A., Wolfrom, M.L. /1966/ J. Chromatogr. 23, 309.
53. Brenner, M., Niederwieser, A., Pataki, G. /1962/ in: Dünnschicht-Chromatographie /Szerk: Stahl, E./ Springer-Verlag, Heidelberg, p. 403.
54. Brenner, M., Niederwieser, A. /1967/ Methods in Enzymol. 11, 39.

55. Shellard, E.J., Jolliffe, G.H. /1967/ J. Chromatogr. 31, 82.
56. Fussi, F., Fedeli, G.F. /1968/ Boll. Chim. Farm. 107, 711.
57. Dévényi, T., Hazai, I., Ferenczi S., Bati, J. /1971/ Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. 7, 273.
58. Hrabák, A., Ferenczi, S. /1971/ Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 383.
59. Pataki, G. /1964/ J. Chromatogr. 16, 541.
60. Inczédy, J. /1962/ Ioncserélők analitikai alkalmazása, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, pp. 52-130.
61. Inczédy, J. /Szerk./ /1980/ Ioncserélők és alkalmazásuk, Műszaki Könyvkiadó, Budapest pp. 39-61.
62. Boross, L. /1968/ Ioncserés kromatográfia a szerves és biokémiában. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, pp. 57-65.
63. Glueckauf, E. /1955/ Trans. Faraday Soc. 51, 34.
64. Horváth, Cs., Melander, W.R. /1983/ /Szerk.: Heftmann E./ in: Chromatography, Journal of Chromatography Library Vol. 22A, Elsevier Scientific Publ. Comp. Amsterdam-Oxford-New York, p. A47.
65. Ettre, L.S. /1981/ J. Chromatogr. 220, 29.
66. Spackman, D.H., Stein, W., Moore, S. /1958/ Anal. Chem. 30, 1181.
67. Spackman, D.H. /1963/ Fed. Proc. 22, 244.

68. Hamilton, P.B., Bogue, D.C., Anderson, R.A. /1960/
Anal. Chem. 32, 1782.
69. Stein, W.H., Moore, S.Y. /1949/ Cold Spring Harbor
Symp. Quant. Biol. 14, 179.
70. James, L.B. /1978/ J. Chromatogr. 152, 289.
71. Blackburn, S. /Szerk./ /1978/ Amino Acid Detection
2nd Edn. M. Dekker Inc. New York, p. 1
72. Benson, J. R. /1973/ Applications of the Newer
Techniques of Analysis /Szerk: Simmons, I.L.
Ewing, G.W./ Plenum New York, p. 223.
73. Kenney, W.C., McIntire, W., Steenkamp, D.J. /1978/
Febs. Letters. 85, 137.
74. Edman, P. /1950/ Acta Chem. Scand. 4, 227, 283.
75. Gray, W.R., Hartley, B.S. /1963/ Biochem J. 89,
59P.
76. Lai, C.Y., Dietzschold, B. /1981/ Biochem. Biophys.
Res. Comm. 103, 536.
77. Kageyama, T., Takahashi, K. /1982/ Biochem. Biophys.
Res. Comm. 107, 1117.
78. Scheffler, J.-J., Tsugita, A., Linden, G.,
Schweitz, H., Lazdunski, M. /1982/ Biochem.
Biophys. Res. Comm. 107, 272.
79. Akabori, S., Ohno, K., Narita, K. /1952/ Bull.
Chem. Soc. Japan 25, 214.

80. Nagy, J., Mazsaroff, I., Várady, L., Knoll, J.:
"Studies on the Purification and Properties of
Satietin on Anorexigenic Glycoprotein of Biological
Origin" in: Chromatography, the State of the Arts
/Eds.: Kalász, H., Ettre, L.S./ Akadémiai Kiadó-
Elsevier, Budapest-Amsterdam /in press/.
81. Weber K., Osborn, M. /1963/ J. Biol. Chem. 244,
4406.
82. Kerese, I. /Szerk/ /1975/ Fehérjevizsgálati mód-
szerek, Műszaki Kiadó, pp. 158-159.
83. Dévényi, T. /1968/ Acta Biochem. Biophys. Acad.
Sci. Hung. 3, /4/ p. 429.
84. Li, Y.-T., Li, S.-C. /1970/ J. Biol. Chem. 245,
825.
85. Várady, L., Nagy, J., Knoll, J. /1984/ IUPAC 14th
International Symposium, July 9-14 "Recent advances
in properties of human satietin I. Electrophoretic
analysis in SDS-polyacrylamide gels" 84 p. 653